

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SIMONE MARTINS DE OLIVEIRA

**EFEITOS DE MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS SOBRE A LIBERAÇÃO DE
ESPÉCIES REATIVAS POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS E A EXPRESSÃO DE
MARCADORES DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS.**

CURITIBA,

2010

SIMONE MARTINS DE OLIVEIRA

**EFEITOS DE MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS SOBRE A LIBERAÇÃO DE
ESPÉCIES REATIVAS POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS E A EXPRESSÃO DE
MARCADORES DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS.**

**Tese de doutorado apresentada como
requisito parcial à obtenção do grau de
Doutor no programa de Biologia Celular
e Molecular do Departamento de
Biologia Celular, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do
Paraná**

**Orientadora: Prof^a Dr^a Dorly de F.
Buchi**

**CURITIBA,
2010**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir passar por momentos como esse, tão especiais e únicos em minha caminhada, e por todas as pessoas insubstituíveis que fizeram parte dele!

A minha família, minha vida: meus pais João e Joana, anjos que Deus tirou do seu lado pra que pudessem cuidar de mim nessa vida. São meu espelho, minha força de vontade, meu começo e meu fim. A garra de vocês, o desejo de me ver feliz, o amor que transborda no olhar, os vários sacrifícios para que eu pudesse chegar até aqui, são impossíveis de serem agradecidos com um simples obrigado. Não há como retribuir, a não ser fazendo o que vocês mais pedem para cada um de seus filhos: sendo feliz! Aos meus “seguranças”, meus irmãos que se pudessem transformavam todos os meus dias em festa. Sempre me apoiaram e me incentivaram. Sidney, irmão mais velho, que mesmo sendo tão diferente, somos tão parecidos. Obrigada por sempre estar comigo quando preciso. Sandrinho, meu irmãozinho de 1,85 metros! Meu companheiro que sempre me deu força. Essas 4 pessoas são mágicas, me transformam na mulher mais inteligente e linda do mundo, me fazem rir e achar todos meus erros bobos e acreditar que tudo é possível. Com vocês eu sei que posso ir para onde eu quiser, fazer o que eu quiser, pois sei que sempre posso voltar para casa! Foram vocês que me ensinaram o primeiro sentido da palavra amor!

Ao meu namorado, Ronaldo, que chegou de mansinho na minha vida e justo nos momentos mais difíceis desse trabalho. A sua incrível capacidade de me desarmar fez com que, mesmo estando distante, estivesse sempre ao meu lado, me ouvindo, dando conselhos e levantando minha auto estima. Deu-me seu colo e forças para eu nunca desistir. Mostrou-me que tudo o que eu tenho é consequência daquilo que eu busquei! Nada é por acaso! Amadureci, cresci e aprendi uma nova forma de amar com você!

À Dorly! São tantos anos juntas, tantos ensinamentos, tanto companheirismo, tantos conselhos, que não sei por onde começar a agradecer. Obrigada por me aceitar como eu sou, e por tentar me fazer enxergar o mundo de outra forma. Além de seus ensinamentos científicos, sua maneira de lidar com a vida, de encarar os problemas e conviver com as outras pessoas, foram os maiores

aprendizados que eu tive fora da casa dos meus pais. A maior parte do meu crescimento pessoal depois de adulta foi com você!

Agradeço aos vários companheiros de laboratório. Nesses anos, muitas pessoas fizeram parte do meu dia a dia, muito mais do que familiares e amigos de infância. O que fez com que se tornassem verdadeiros confidentes e amigos. Pois somente amigos conseguem conviver com variações de humor constante, experimentos planejados por dias que resultam em nada e mutirões de limpeza de 16 horas seguidas! Alguns já não participaram da fase final desse trabalho, mas tem sua mãozinha em algumas dessas páginas. À Bia, que com seu carinho, atenção e longas conversas fez com que eu me conhecesse melhor. Ao Fer, que sempre tinha uma nova sugestão para meu trabalho. À Karine, por sua disponibilidade e amizade. Ao Raffa, sempre pronto, seja para uma colaboração no laboratório ou para uma festa. A Caro, minha “irmã gêmea”! Muito obrigada por tudo, pelo ombro amigo, pelas nossas festas, risadas e ajuda logo nos primeiros passos da tese. A Edy “nossa filha”! Obrigada por toda a sua ajuda, disponibilidade, consideração e preocupação. A Ana Paula que sempre esteve do meu lado. Nos momentos bons e ruins, tanto dos experimentos quanto da vida! Obrigada amiga, você foi praticamente meu “diário ambulante”! Sua presença tornou meus dias mais leves e fáceis. Aos novatos do lab, Rafael, Gustavo, Jenifer, Diogo, Eneida, Lucas. Obrigada pela disposição. Sem vocês grande parte desse trabalho não seria possível. Aos agregados, como a Beth e o professor Juarez, por estarem sempre prontos a nos ajudar. Obrigada pelo seu carinho e atenção!

A ex secretária do departamento, Gerizalda e a secretária do programa de pós graduação em Biologia Celular e Molecular Marlene!

Ao pessoal do biotério, a Izelen, Cândido, Júlio, Luís, e demais funcionários que nunca deixaram de atender nossos pedidos de última hora e principalmente por todo o apoio técnico. Agradeço em especial aos camundongos, obrigada por se permitirem participar das nossas pesquisas!

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR. Em especial a Regina e a Rosângela que sempre foram atenciosas e prestativas e ao professor Ney por todos os seus ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Sílvio Sanches Veiga por permitir o uso de seu laboratório e equipamentos, e aos seus alunos por toda a atenção dedicada.

Ao Prof. Luís Cláudio Fernandes e todos os seus alunos que possibilitaram o uso de seus equipamentos, colaborações, discussões científicas e principalmente pela amizade.

Ao Prof. Edvaldo, sempre disposto a solucionar um problema e colaborar com suas sugestões.

Ao Seu Nino, pelo seu sorriso sempre amável, pela sua disponibilidade e ajuda nas técnicas de coloração e cuidado com os microscópios. Sua paz e serenidade tornam nosso local de trabalho mais aconchegante!

A CAPES pela bolsa de estudos concedida durante o período da realização de minha tese e à Secretaria de Ciência e Tecnologia pela concessão de recursos para a pesquisa, tornando financeiramente viável todos os experimentos.

A todos os meus amigos, que de alguma forma sempre me incentivaram, me apoiaram e me confortaram. Não vou citar todos os nomes aqui, mas vocês sabem o quanto são essenciais na minha vida. Obrigada por torná-la tão especial e mais prazerosa!

Todas as pessoas que passaram pela minha vida nestes anos, mesmo sem saber, deixaram algum ensinamento o qual tento sempre levá-lo comigo. Por isso, muito obrigada a todos!

*“A vida é construída nos sonhos...
...E concretizada no amor!”*

Chico Xavier

RESUMO

Alguns tratamentos homeopáticos modulam o sistema imunológico. Com o objetivo de verificar a ação de medicamentos homeopáticos, estudos com macrófagos peritoneais e células da medula óssea de camundongos foram realizados com *Mercurius solubilis* (Merc sol), *Aconitum napellus* (Acon), *Atropa Belladonna* (Bell), *Arsenicum album* (Ars), *Lachesis muta* (Lach), *Thuya occidentalis* (Thuy) e *Bryonia alba* (Bry). Estes medicamentos, além de serem utilizadas na clínica para tratamento de doenças inflamatórias e infecciosas, demonstraram, em trabalho anterior, ação sobre macrófagos. Liberação de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e anion superóxido (O_2^-) por macrófagos foram analisados *in vitro* (antes e após interação com leveduras) e *ex vivo* em reação colorimétrica. Células da medula óssea foram imunomarcadas: *ex vivo* para linhagem hematopoiética e após cultivo e cocultivo com macrófagos para CD11b, todos quantificados em citometria de fluxo. Os macrófagos cocultivados foram processados para Microscopia Eletrônica de Varredura. Todos os medicamentos ativaram morfológicamente estas células e aumentaram a liberação de NO *in vitro*. Merc sol diminuiu a liberação de O_2^- *in vitro*, *ex vivo* e H_2O_2 após interação com levedura. Aumentou a expressão de CD3 *ex vivo*, e CD11b não aderente *in vitro*. Acon diminuiu NO, O_2^- e H_2O_2 após leveduras e O_2^- *ex vivo*. Aumentou H_2O_2 e CD45R *ex vivo* e CD11b não aderente *in vitro*. Bell diminui O_2^- e H_2O_2 após leveduras e O_2^- *in vitro*. Aumentou O_2^- *ex vivo*, CD45R e diminuiu Ly-6G. Ars diminuiu NO após leveduras, O_2^- *in vitro* e *ex vivo* e H_2O_2 *ex vivo*, Aumentou a expressão de CD3 e CD11c *ex vivo* e CD11b aderente da co-cultura. Lach aumentou NO *ex vivo*, diminuiu NO e H_2O_2 após levedura e O_2^- e H_2O_2 *in vitro* e *ex vivo*. Aumentou expressão de CD3, CD45R, CD11c *ex vivo* e diminui CD11b *ex vivo* e em não aderentes da co-cultura. Thuy diminuiu O_2^- *in vitro*, com levedura e *ex vivo*. Aumentou CD3, CD45R e CD11c *ex vivo*, e em co-cultura CD11b aderente e diminui não aderente. Bry aumentou H_2O_2 e diminuiu O_2^- *ex vivo*. Aumentou Ly-6G, CD11c e CD11b *ex vivo*, e e em co-cultura CD11b aderente e diminui não aderente. Dessa maneira, pode-se dizer que medicamentos homeopáticos ativam macrófagos, promovem melhora na defesa celular e redução de estresse oxidativo, e atuam na diferenciação e/ou proliferação das células de medula óssea

Palavras chave: medicamentos homeopáticos; macrófago; células de medula óssea; espécies reativas de nitrogênio e oxigênio.

ABSTRACT

Homeopathic medications can modulate the immune system. Here we describe the results of some experimental laboratory studies aimed at verifying the efficacy of homeopathic medicines in peritoneal macrophages and bone marrow cells with *Mercurius solubilis* (Merc sol), *Aconitum napellus* (Acon), *Atropa Belladonna* (Bell), *Arsenicum album* (Ars), *Lachesis muta* (Lach) e *Thuya occidentalis* (Thy) and *Bryonia alba* (Bry). Previous studies demonstrated that this medication activates macrophages. Nitric oxide (NO), hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide (O_2^-) released were analyzed *in vitro* (before and after interaction with yeast) and, *ex vivo* by colorimetric reaction. Bone marrow cells incubated with hematopoietic lineage markers after *ex vivo* treatment and with CD11b after culture and coculture with macrophage and read with flow cytometry. Co-cultured macrophages were processed to scanning electron microscope. These cells were determined activated by morphology changes after treatment and increased NO release. Merc sol decreased O_2^- released *in vitro*, *ex vivo* and H_2O_2 after incubation with yeast. It also increased CD3 expression *ex vivo*, and CD11b nonadherent *in vitro*. Acon decreased NO, O_2^- and H_2O_2 after incubation with yeast and O_2^- *ex vivo*. Besides, it increased H_2O_2 and CD45R *ex vivo* and CD11b nonadherent *in vitro*. Bell decreased O_2^- and H_2O_2 after yeast and O_2^- *in vitro* and, *ex vivo* increased O_2^- , CD45R and decreased Ly-6G. Ars decreased NO after yeast, O_2^- *in vitro* and *ex vivo* and H_2O_2 *ex vivo*, Increased CD3 and CD11c expression *ex vivo* and CD11b adherent co-culture. Lach increased NO *ex vivo*, decreased NO and H_2O_2 after yeast and O_2^- e H_2O_2 *in vitro* and *ex vivo*. Increased CD3, CD45R, CD11c *ex vivo* expression and decreased CD11b *ex vivo* and in nonadherent co-culture. Thuy decreased O_2^- *in vitro*, after yeast and *ex vivo*. Increased CD3, CD45R e CD11c *ex vivo*, and CD11b adherent co-culture and diminished nonadherent. Bry increased H_2O_2 and decrease O_2^- *ex vivo*. Increased Ly-6G, CD11c and CD11b *ex vivo*, and CD11b adherent in co-culture, and decreased nonadherent. cells. With these results, it is possible to state that homeopathic medicines can activate macrophages, promote cellular defense, diminish oxidative stress and, probably act on bone marrow cells differentiation and proliferation.

Key words: homeopathic medicine; macrophage; bone marrow cells; reactive oxygen and nitrogen species.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	IMAGENS DA FONTE DE ORIGEM DOS PRODUTOS ALTAMENTE DILUÍDOS UTILIZADOS.	13
FIGURA 2	ORIGEM DOS MONÓCITOS	25
FIGURA 3	HETEROGENEIDADE DE MONÓCITOS/MACRÓFAGOS DURANTE DIFERENCIAÇÃO <i>IN VIVO</i>	26
FIGURA 4	ESQUEMA DA PLACA DE CO-CULTURA	42
FIGURA 5	FIGURAS ILUSTRANDO COMO FOI REALIZADO O TRATAMENTO DOS CAMUNDOGOS COM O MEDICAMENTO 9	44
FIGURA 6	ESQUEMA DE HEMATOPOIESE MOSTRANDO A PARTIR DE QUAL LOCAL PROVAVELMENTE OS MEDICAMENTOS COMEÇAM A AGIR	55
FIGURA 7	LIBERAÇÃO DE NO POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> COM MERC SOL	58
FIGURA 8	LIBERAÇÃO DE O_2^- LIBERADO POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> COM MERC SOL	59
FIGURA 9	LIBERAÇÃO DE H_2O_2 POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> COM MERC SOL	61
FIGURA 10	LIBERAÇÃO DE O_2^- POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> DOS CAMUNDONGOS COM MERC SOL.	62
FIGURA 11	LIBERAÇÃO DE H_2O_2 POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> DOS CAMUNDONGOS COM MERC SOL	62
FIGURA 12	EFEITOS DO MERC SOL NA LIBERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVA	63
FIGURA 13	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM MERC SOL EM CO-CULTURA	64
FIGURA 14	CD3 ϵ^+ EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> COM MERC SOL	65
FIGURA 15	CD11b $^+$ EM CÉLULAS NÃO ADERENTES DE MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> COM MERC SOL	67
FIGURA 16	CD11b $^+$ DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA NÃO ADERENTES EM CULTURA E CO-CULTURA	68
FIGURA 17	LIBERAÇÃO DE NO POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> COM ACON	71
FIGURA 18	LIBERAÇÃO DE O_2^- POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM ACON	72
FIGURA 19	LIBERAÇÃO DE H_2O_2 POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM ACON	73
FIGURA 20	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM ACON CH30 EM CO-CULTURA	75
FIGURA 21	CD45R $^+$ EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> COM ACON	76

FIGURA 22	CD11b ⁺ EM CÉLULAS NÃO ADERENTES DE MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> COM ACON	77
FIGURA 23	CD11b ⁺ DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA NÃO ADERENTES EM CULTURA E CO-CULTURA	79
FIGURA 24	LIBERAÇÃO DE NO POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> COM BELL	80
FIGURA 25	LIBERAÇÃO DE O ₂ ⁻ POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM BELL	81
FIGURA 26	LIBERAÇÃO DE O ₂ ⁻ POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM BELL	82
FIGURA 27	LIBERAÇÃO DE H ₂ O ₂ POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM BELL.	83
FIGURA 28	EFEITOS DO TRATAMENTO COM BELL CH30 <i>IN VITRO</i> E <i>IN VITRO</i> COM POSTERIOR INTERAÇÃO COM LEVEDURA	85
FIGURA 29	EFEITOS DO TRATAMENTO COM BELL CH6 E 200 <i>IN VITRO</i> E <i>IN VITRO</i> COM POSTERIOR INTERAÇÃO COM LEVEDURA	85
FIGURA 30	LIBERAÇÃO DE O ₂ ⁻ POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> COM BELL	86
FIGURA 31	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM BELL CH200 EM CO-CULTURA	88
FIGURA 32	Ly-6G ⁺ E CD45R ⁺ EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> COM BELL	89
FIGURA 33	LIBERAÇÃO DE NO POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> COM ARS	94
FIGURA 34	LIBERAÇÃO DE O ₂ ⁻ POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM ARS	95
FIGURA 35	LIBERAÇÃO DE H ₂ O ₂ POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM ARS	96
FIGURA 36	MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM ARS EM CO-CULTURA	97
FIGURA 37	CD3ε ⁺ E CD11c ⁺ EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> COM ARS	98
FIGURA 38	CD11b ⁺ EM CÉLULAS ADERENTES DE MEDULA ÓSSEA APÓS CO-CULTURA COM MACRÓFAGOS E TRATAMENTO COM ARS	100
FIGURA 39	CD11b ⁺ DE CÉLULAS NÃO ADERENTE EM CULTURA E CO-CULTURA.	102
FIGURA 40	LIBERAÇÃO DE NO POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> COM LACH	104
FIGURA 41	LIBERAÇÃO DE O ₂ ⁻ POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM LACH	105
FIGURA 42	LIBERAÇÃO DE H ₂ O ₂ POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM LACH	106
FIGURA 43	EFEITOS DO TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> COM LACH	107
FIGURA 44	EFEITOS DO TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> COM LACH E POSTERIOR INTERAÇÃO COM LEVEDURAS	108

FIGURA 45	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM LACH CH200 EM CO-CULTURA	109
FIGURA 46	CD3 ϵ^+ , CD11b $^+$, CD45R $^+$ E CD11c $^+$ EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> COM LACH	110
FIGURA 47	CD11b $^+$ EM CÉLULAS NÃO ADERENTES DE MEDULA ÓSSEA APÓS CO-CULTURA COM MACRÓFAGOS E TRATAMENTO COM LACH	113
FIGURA 48	CD11b $^+$ DE CÉLULAS NÃO ADERENTE EM CULTURA E CO-CULTURA.	114
FIGURA 49	EFEITOS DE LACH NOS MARCADORES HEMATOPOIÉTICOS DAS CÉLULAS DA MEDULA APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> E CO-CULTURA	115
FIGURA 50	LIBERAÇÃO DE NO POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> COM THUY	117
FIGURA 51	LIBERAÇÃO DE O $_2^-$ POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM THUY	118
FIGURA 52	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM THUY EM CO-CULTURA	120
FIGURA 53	CD3 ϵ^+ , CD45R $^+$, E CD11c $^+$ EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> COM THUY	121
FIGURA 54	CD11b $^+$ EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS CO-CULTURA COM MACRÓFAGOS TRATADOS <i>IN VITRO</i> COM THUY	124
FIGURA 55	CD11b $^+$ EM CÉLULAS ADERENTES DE MEDULA ÓSSEA APÓS CO-CULTURA COM MACRÓFAGOS TRATADOS <i>IN VITRO</i> COM THUY	124
FIGURA 56	CD11b $^+$ DE CÉLULAS NÃO ADERENTE EM CULTURA E CO-CULTURA.	125
FIGURA 57	LIBERAÇÃO DE O $_2^-$ POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> COM BRY	128
FIGURA 58	LIBERAÇÃO DE H $_2$ O $_2$ POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> COM BRY	129
FIGURA 59	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM BRY EM CO-CULTURA	131
FIGURA 60	Ly6G $^+$, CD11b $^+$, E CD11c $^+$ EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> COM BRY	132
FIGURA 61	CD11b $^+$ EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS CO-CULTURA COM MACRÓFAGOS TRATADOS <i>IN VITRO</i> COM BRY	133
FIGURA 62	CD11b $^+$ EM CÉLULAS ADERENTES DE MEDULA ÓSSEA APÓS CO-CULTURA COM MACRÓFAGOS TRATADOS <i>IN VITRO</i> COM BRY	134
FIGURA 63	CD11b $^+$ DE CÉLULAS NÃO ADERENTE EM CULTURA E CO-CULTURA.	135

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	ESTRATÉGIA GERAL DE TRABALHO	37
	SOLUÇÕES ALTAMENTE DILUÍDAS USADAS PARA O	40
QUADRO 2	TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> DE MACRÓFAGOS	
	PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS PARA ANÁLISES DA	
	DETECÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS	
QUADRO 3	SOLUÇÕES ALTAMENTE DILUÍDAS USADAS PARA O	43
	TRATAMENTO DOS CAMUNDONGOS	
QUADRO 4	ANTICORPOS UTILIZADOS PARA IMUNOFENOTIPAGEM	48
QUADRO 5	RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CH – Centesimal Hannemaniana

Merc sol – *Mercurius solubilis*

Acon - *Aconitum napellus*

Bell - *Atropa Belladonna*

Ars - *Arsenicum album*

Lach - *Lachesis muta*

Thuy - *Thuya occidentalis*

Bry – *Bryonia alba*

APC – Antigen-presenting cell

CTH – Célula-Tronco Hematopoiética

LPS – Lipopolissacarídeo

GM-CSF- Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

M-CSF- Macrophage colony-stimulating factor

CD – Cluster Differentiation

RNS – Reactive Nitrogen Species

ROS – Reactive Oxygen Species

NO – Nitric Oxide

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

O₂⁻ - Ânion superóxido

iNOS - Inductible Nitric Oxide Synthase

ONOO⁻- Peroxinitrito

NOX – NADPH oxidase family

NOX2 – Subunidade catalítica da NOX

SOD- Superóxido Dismutase

PE – Phycoeritrina

M - Molar

INF – Interferon

IL-4 – Interleucina-4

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

PMA – Phorbol Myristate Acetate

NK – Natural Killer

Leved - Levedura

Co cult – Co-cultura

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3	JUSTIFICATIVA	34
4	OBJETIVOS	36
4.1	OBJETIVO GERAL	36
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5	MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1	MEDICAMENTOS	38
5.2	ANIMAIS	38
5.3	CÉLULAS	39
5.3.1	MACRÓFAGOS PERITONEAIS	39
5.3.2	CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA	39
5.4	CULTIVO DE MACRÓFAGOS E TRATAMENTO <i>IN VITRO</i>	40
5.4.1	CULTIVO DE MACRÓFAGOS	40
5.4.2	TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> DOS MACRÓFAGOS	40
5.5	CULTURA DAS CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA, CO-CULTURA E TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> .	41
5.5.1	CULTIVO DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA	41
5.5.2	CO-CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS COM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA	41
5.5.3	TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> EM CO-CULTURA E CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA.	42
5.6	TRATAMENTO DOS CAMUNDONGOS	43
5.7	ESTUDOS REALIZADOS COM MACRÓFAGOS.	44
5.7.1	INTERAÇÃO DE MACRÓFAGOS COM LEVEDURAS.	44
5.7.2	AVALIAÇÃO DA DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).	45
5.7.3	AVALIAÇÃO DA DETECÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H ₂ O ₂)	45
5.7.4	AVALIAÇÃO DA DETECÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO (O ₂ ⁻)	46
5.7.5	ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS MACRÓFAGOS ATRAVÉS COM MEV	47
5.8	ESTUDOS REALIZADOS COM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA.	47
5.8.1	IMUNOFENOTIPAGEM DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO DOS CAMUNDONGOS	47
5.8.2	<i>IN VITRO</i> E CO-CULTURA	48
5.8.2.1	Detecção de CD11b em células da medula óssea em citometria de fluxo	48
5.8.2.2	Detecção e quantificação de CD11b em células aderentes da medula óssea através de microscopia confocal.	48
5.9	ESTATÍSTICA	49
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
6.1	RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL	51
6.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO INDIVIDUAL	58
6.2.1	<i>MERCURIUS SOLUBILIS</i>	58

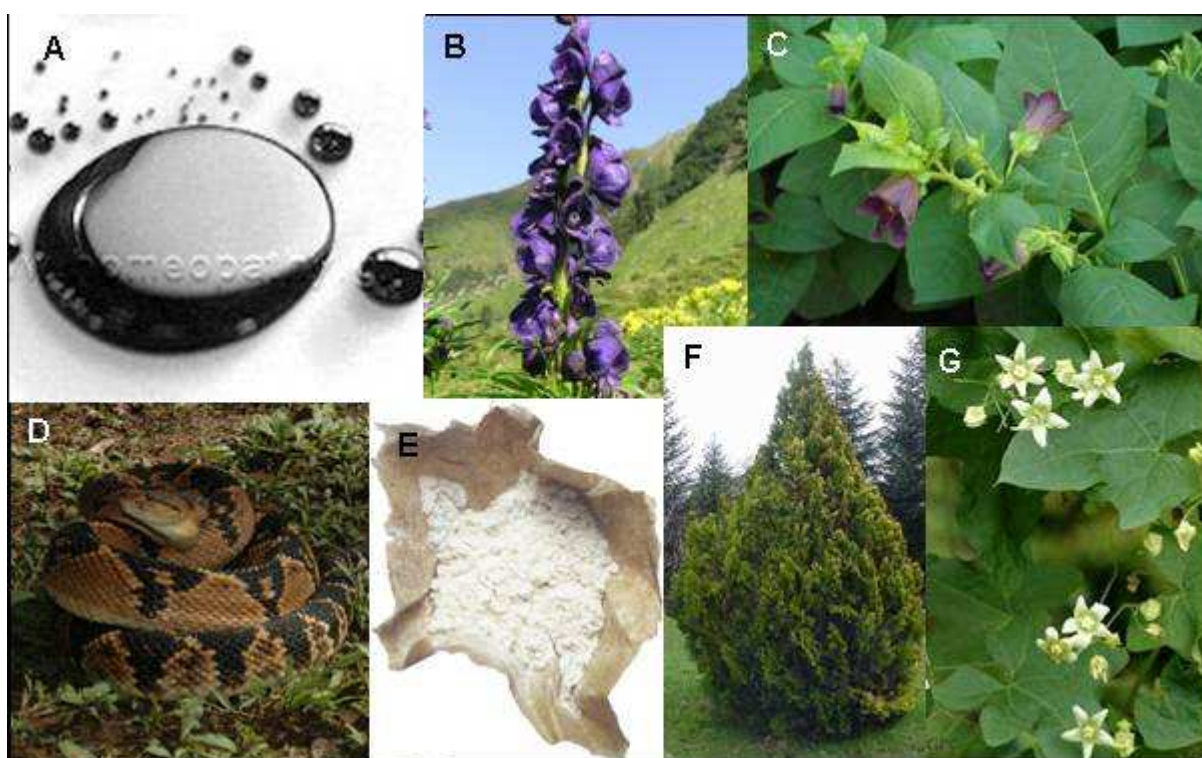
6.2.2	<i>ACONITUM NAPELLUS</i>	70
6.2.3	<i>ATROPA BELLADONNA</i> (BELADONA)	80
6.2.4	<i>ARSENICUM ALBUM</i>	93
6.2.5	<i>LACHESIS MUTA</i>	103
6.2.6	<i>THUYA OCCIDENTALLIS</i>	117
6.2.7	<i>BRYONIA ALBA</i>	128
7	<u>CONCLUSÕES</u>	137
7.1	CONCLUSÃO GERAL	137
7.2	CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	137
	<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	137
	REFERÊNCIAS	139
	<u>ANEXO 1 - OBTENÇÃO E COLETA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO</u>	154
	<u>ANEXO 2 - OBTENÇÃO E COLETA DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGO</u>	155
	<u>ANEXO 3 - MEIO DE CULTURA DULBECCO'S MODIFIED EAGLE MEDIUM (DMEM)</u>	156
	<u>ANEXO 4 – INTERAÇÃO MACRÓFAGOS-LEVEDURA</u>	157
	<u>ANEXO 5 – DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)</u>	158
	<u>ANEXO 6 – DETECÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂)</u>	159
	<u>ANEXO 7 – DETECÇÃO DE ANION SUPERÓXIDO (O₂⁻)</u>	160
	<u>ANEXO 8 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA</u>	161
	<u>ANEXO 9 - IMUNOCITOQUÍMICA PARA CITOMETRIA DE FLUXO</u>	162
	<u>ANEXO 10 - IMUNOCITOQUÍMICA PARA MICROSCOPIA CONFOCAL</u>	163
	<u>ANEXO 11 - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA</u>	165

1 INTRODUÇÃO

A homeopatia é um sistema de tratamento que coloca em ação os mecanismos de cura do próprio corpo. Devido à alta diluição, não apresenta efeitos tóxicos, produzindo pouco ou nenhum efeito colateral. Um organismo que elimina uma doença por conta própria tem mais chance de continuar saudável e evitar a recorrência. Esse tipo de tratamento se dá de acordo com a velocidade de reparo natural do próprio corpo, portanto, pode levar mais tempo do que os os convencionais, os quais são rápidos, mas também afetam as partes saudáveis do corpo, muitas vezes produzindo efeitos colaterais indesejados (JONAS; JACOBS, 1996). A confiabilidade dos princípios da homeopatia (cura pelo semelhante, globalidade da cura e da utilização de altas diluições de substâncias) e suas bases científicas podem ser avaliadas através de várias abordagens teóricas e experimentais. Nosso objetivo, neste trabalho, não é justificar o uso clínico de medicamentos homeopáticos, mas de apresentar evidências de que as substâncias preparadas de acordo com o método homeopático podem ter efeito sobre o sistema imunológico. Este pode ser um passo importante para uma reavaliação da homeopatia como um campo de valor para a investigação básica e clínica.

Desde 1998, diversos experimentos em nosso laboratório (Laboratório de Estudos de Células Neoplásicas e Inflamatórias- UFPR) demonstraram a ação de compostos preparados homeopaticamente em células do sistema imunológico. Em 2004, iniciou-se um trabalho com substâncias únicas altamente diluídas homeopaticamente, as quais, segundo médicos homeopatas consultados previamente, são indicadas no tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias. Portanto, poderiam ter efeito sobre macrófagos, modelo de estudo do nosso laboratório. Neste trabalho, que resultou em uma dissertação de mestrado, verificou-se que diversas potências de 7 substâncias alteravam funções dos macrófagos peritoneais de camundongo (OLIVEIRA, 2005). Como os macrófagos realizam a intercomunicação entre a resposta inata e a adaptativa do sistema imunológico (GORDON, 1999), essas células foram o alvo inicial dos nossos experimentos. Com o objetivo de continuar então, estudando a ação dessas substâncias, chamadas de medicamentos homeopáticos, deu-se início a esse trabalho. No entanto, algumas potências testadas anteriormente por OLIVEIRA,

2005 não foram usadas por não alterarem alguns dos parâmetros estudados inicialmente. Para os estudos *in vitro* foram testadas 6 substâncias em diferentes diluições as quais serão descritas posteriormente (FIGURA 1). Todas essas substâncias alteraram as funções efectoras dos macrófagos peritoneais. Esses resultados sugeriram uma possível ação desses medicamentos sobre os precursores das células do sistema imunológico, da mesma forma que outros medicamentos homeopáticos estudados por nosso grupo (ABUD, *et al.*, 2006, CESAR, *et al.*, 2008; 2009). Baseado nessas observações preliminares, foram realizados experimentos *ex vivo* com células de medula óssea, *in vitro* e co-cultivo com macrófagos peritoneais, para avaliar se o efeito medicamento sobre a medula é dependente destas células. Nesta segunda etapa foram utilizadas apenas as potências que obtiveram os resultados mais relevantes. Além disso, foi adicionado o medicamento *Bryonia alba*, a qual havia sido retirada por não ter mostrado ação direta sobre macrófagos peritoneais. Como agora seriam estudadas outras células do sistema imunológico, nós optamos por reinseri-la e avaliar o seu possível efeito.



A- mercúrio líquido; B – *Aconitum napellus*; C – *Atropa belladonna*; D – *Lachesis muta*; E – *Arsenicum album*; F- *Thuja occidentalis*; G- *Bryonia alba*

FIGURA 1 – IMAGENS DA FONTE DE ORIGEM DOS PRODUTOS ALTAMENTE DILUÍDOS UTILIZADOS.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A palavra homeopatia vem do grego e significa semelhante à doença (TOLEDO, 1910). Têm por base tratar as enfermidades usando uma série de substâncias derivadas de plantas, animais, minerais, substâncias químicas sintéticas ou drogas convencionais, todas em quantidades ínfimas, usando um processo de preparação especial, com o objetivo de colocar em ação os mecanismos de cura do próprio corpo (JONAS; JACOBS, 1996; NOGUEIRA, *et al.* 1986). Esse sistema terapêutico foi criado no século XVIII pelo médico alemão Samuel Christian Hahnemann (1755-1843) fundamentado no princípio da similitude “*similia similibus curantur*” que significa o “semelhante cura o semelhante” (BAROLLO, 1995).

O processo de elaborar os remédios é muito preciso. As substâncias solúveis como os extratos vegetais e animais, se dissolvem em uma solução de álcool e água destilada. Já substâncias de difícil solubilidade, como ouro, são primeiramente moídas, até chegar a um pó fino, e então diluída no mesmo tipo de solução alcoólica.. À esta solução, depois de filtrada, dá-se o nome de tintura mãe. A tintura mãe é usada, então, para produzir as diferentes potências, as quais constituem as diferentes diluições dinamizadas dos medicamentos homeopáticos (SHEALY, 1999).

Após testar um medicamento detalhadamente em várias pessoas, Hahnemann começou a testar a precisão desses perfis medicamentosos, usando-o nos enfermos. A princípio, deu-lhes a dose normal, mas teve o mesmo problema que abominava na prática convencional. Muitos dos medicamentos eram tóxicos e causavam efeitos colaterais nocivos. Começou então a diluir os medicamentos, administrando-os em doses cada vez menores. Ao contrário do que ele supôs – que, se reduzisse a dosagem dos medicamentos, eles se tornariam menos eficazes – descobriu que se fossem dados de acordo com o padrão de sintomas encontrados nas experimentações, eram mais eficazes e seu efeito mais duradouro. Essas observações de Hahnemann evidenciaram que as doses curativas eram sempre muito menores que as doses que haviam produzido sintomas semelhantes durante seus ensaios em um homem são (TOLEDO, 1910; JONAS; JACOBS, 1996; BELLAVITE, *et al.*, 2005).

Hahnemann começou a usar a “sucussão”, ou seja, a agitar as diluições enquanto eram realizadas. Por mais estranho que pareça atualmente, na época era

uma prática comum – os alquimistas freqüentemente sacudiam, mexiam e realizavam várias outras manipulações nas soluções a fim de ativar a “força vital” ou “espiritual” que acreditavam ser inerente a todas as substâncias.

Embora sua intenção original tenha sido reduzir os efeitos tóxicos dos medicamentos, Hahnemann observou que o processo de sucussão entre cada diluição tornava os remédios mais ativos e específicos aos indivíduos sensíveis a eles. Quando preparados dessa maneira, que Hahnemann chamava de “dinamização”, a eficácia do medicamento dependia ainda mais da adequação detalhada do quadro sintomático do teste ao quadro sintomático único do paciente. (BELLAVITE, *et al.*, 2005; JONAS; JACOBS, 1996). Potência diz-se do resultado final do processo de dinamização (NOGUEIRA *et al.*, 1986).

A grafia dos medicamentos homeopáticos obedece aos ensinamentos de Hahnemann, que adotou a língua latina e as regras da nomenclatura botânica. A grafia é a aprovada pela Liga Homeopática Internacional. Os medicamentos são representados pelos nomes seguidos de um ou mais algarismos, formando um número e antepostos do símbolo da escala que se deseja; ex.: *Bryonia alba* CH 12, onde o medicamento foi preparado pela escala centesimal até a 12ª potência. Simboliza-se a escala centesimal, mais usada, pela letra C ou CH (maiúsculas), a escala decimal por D, DH ou X (maiúsculas) e a escala cinqüenta milésimal por /50.000, precedida pela potência que se deseja em algarismos romanos, ex.: VIII/50.000 (oitava potência da escala cinqüenta milésimal) (NOGUEIRA *et al.*, 1986).

Alguns remédios homeopáticos como *Aconitum napellus*, *Arsenicum album*, *Belladonna*, *Bryonia alba*, *Mercurius solubilis*, *Thuya occidentalis*, *Lachesis muta* são remédios tão conhecidos que são indicados para uso no estojo de primeiros-socorros (HAYFIELD, 1999).

Mercurius solubilis

À temperatura ambiente, Mercúrio é um elemento encontrado na forma fluida de cor prata metálica ou na forma de sal de sulfeto de cinábrio (mineral presente em fontes termais), a fonte do pigmento vermelho. Sais orgânicos e inorgânicos de mercúrio são usados como antissépticos, preservativos, vacinas, etc. Exposição de mamíferos a componentes mercuriais podem originar imunossupressão e autoimunidade (ARONSON, *et al.*, 2006a). Este metal líquido se dissolve em ácido

nítrico diluído e forma partículas que se secam e pulverizam para uso homeopático (SHEALY, 1999).

Matéria médica:

Usa-se em estados infecciosos agudos em que as glândulas e suas secreções estejam especialmente infectadas, irritabilidade e inquietude (HAYFIELD, 1999). Para as enfermidades da pele que sangram facilmente, ulcerações varicosas, eczemas, etc. Para as enfermidades das membranas mucosas, brônquios, corizas com abundante mucosidade. Para o fígado, icterícia, diarréias líquidas, gonorréias ou blenorragias (TOLEDO, 1910).

Aconitum napellus

Esta planta conhecida como acônito ou napelo é uma das mais venenosas plantas britânicas, sendo que seu veneno é utilizado há séculos. Caçadores imergiam as pontas de flechas em seu suco para caçar os lobos, poços de água eram envenenados durante a guerra, era tida como antídoto para picada de escorpião, entre outros (DAY, 1993; MARKS, 1997; SHEALY, 1999).

Os princípios ativos mais importantes são os alcalóides que têm como ação fisiológica atuar em inflamações, na contração cardíaca e no tônus gastrointestinal. *Aconitum napellus* é muito utilizado em tratamento herbais e medicina chinesa.

Matéria médica:

Nas potências homeopáticas é curativo nos transtornos decorrentes do medo, principalmente da morte, angústia, ansiedade e é também um dos principais remédios homeopáticos para dores em geral (SHEALY, 1999; DAY, 1993). O remédio ajuda no início de resfriados; corrimento nasal claro, febre alta que se iniciam repentinamente, caracterizando processo inflamatório (MARKS; CASSANDRA, 1997; TOLEDO, 1910). Na medicina veterinária também é usada em casos de febre e doenças respiratórias agudas (DAY, 1993).

***Atropa Belladonna* (Beladona)**

Esta planta venenosa cresce por toda a Europa (HAYFIELD, 1999; SHEALY, 1999). Em italiano Belladonna significa “bela mulher”, pois as italianas a utilizam em gotas para os olhos, com o fim de dilatar a pupila e tornarem-se mais atraentes. Na medicina convencional, são utilizados alcalóides para tratar os espasmos e náuseas. O remédio homeopático se prepara com as folhas e flores frescas. (SHEALY, 1999; WALACH *et al.*, 2001). Hahnemann a provou pela primeira vez em 1799. Foi uma

das primeiras substâncias usadas por Hanemann, que a utilizou para tratar febre escarlate (BELLAVITE *et al.*, 2005). Alguns trabalhos usando diversas diluições de *Atropa Belladonna* estão sendo demonstrados com efeitos interessantes. CRISTEA *et al.*, 1997) por exemplo, mostrou que baixas e altas diluições de Belladonna possuem efeito contrários em contrações do duodeno. Quando usadas Bell 1C e 5C, foi observado efeito inibidor espasmolítico (atividade característica da atropina), no entanto Belladonna 30C e 45C mostraram possuir efeito estimulante. E ainda as soluções não dinamizadas não mostraram nenhum efeito.

Matéria médica:

Exerce efeito sobre a circulação, tendo altíssima ação em todas as anginas, em hidrofobia, na gripe, em ciática, em reumatismo, em eripisela, meningite, nos delírios da febre. Para toda a classe de nervos com ataques e acessos (TOLEDO,1910).

Arsenicum album

Arsenicum album é o medicamento preparado de forma homeopática a partir da tintura mãe do trióxido de arsênico, o qual é uma das três formas de óxido de arsênico comerciais usados na agricultura e indústria (MITRA *et al.*, 1998). O arsênico é um elemento metálico (símbolo As), altamente tóxico, o qual existe em diversas formas. Vários minérios contêm formas cristalinas de sais de arsênico, por exemplo, a cobaltita contém sulfeto arsênico de cobalto, a arsenopirita contém sulfeto arsênico de ferro, etc. Na medicina, o Arsênico tem uma história longa. No século XVIII foi usado para tratar malária e tripanossomíase no século XIX. No início do século XX, surgiram compostos para tratar a sífilis e novamente a tripanossomíase. Recentemente, arsênico e sais arsenicais tem sido considerado obsoleto na medicina, devido a sua toxicidade para diversos órgãos e aparentes propriedades cancerígenas (ARONSON, 2006b). Além dos medicamentos arsenicais, pequenas quantidades de arsênico são usadas em ligas, conservantes da madeira, corantes, e tintas, os quais são considerados as principais fontes de contaminação da água por arsênico e a consequente intoxicação de milhares de pessoas (ERNST, 2000; HALL, 2002) Visando à solução deste problema, um grupo de pesquisadores indianos têm estudado o *Arsenicum album* CH30 como provável antagonista e antídoto para envenenamentos com arsênico. (MITRA, *et al.* 1998; MITRA, *et al.*, 1999; KHUDA-BUKHSH, 1997; BELON, *et al.*, 2007). *Arsenicum*

album foi umas das primeiras substâncias usadas por Hanemann que a usou para tratar a cólera (BELLAVITE *et al.*, 2005).

Matéria médica:

Na homeopatia é usado em muitas condições mentais e emocionais sérias e corresponde ao repertório de sintomas caracterizados por ansiedade, desassossego, dores ardentes que são como calores e fraqueza desproporcional à doença (MARKS; CASSANDRA, 1997).

Lachesis muta

Lachesis muta, uma cobra venenosa nativa do Brasil, é pertencente à família Viperidae (DAMICO 2005). O seu veneno possui ação hemolítica, tem o efeito de destruir membranas plasmáticas pela união com proteínas da superfície celular, tornando-as permeáveis para diferentes substâncias e elementos. Pode de causar morte imediata. Seu veneno altamente diluído é freqüentemente usado como medicamento homeopático (JACOBS, *et al.*, 2005; BERNAL-OCHOA, *et al.*, 1997; FRASS *et al.*, 2005), o qual foi provado pela primeira vez pelo Dr. Constantino Hering em 1837, injetando-se o veneno quando ele estava na selva amazônica.

Matéria médica:

A patogenesia homeopática da *Lachesis muta* é muito vasta. As dinamizações deste veneno podem ser indicadas, entre outros, em processos inflamatórios com tendência a tornarem-se gangrenosos, inflamação edematosa e secreções muito fétidas, doenças do sangue, hemorragias, etc. (SHEALY, 1999).

Thuya occidentalis

Thuya occidentalis, conhecida como Arbor vitae ou cedro branco, é originária do leste da América do Norte e é cultivada na Europa como uma árvore ornamental. A planta foi identificada pela primeira vez, durante uma expedição do século 16 no Canadá, onde era usada como um remédio por índios nativos para o tratamento de reumatismo, gota e malária e posteriormente foi revelado ser eficaz no tratamento da fraqueza de escorbuto (SHEALY, 1999). O potencial imunofarmacológico da *Thuya occidentalis*, tem sido demonstrado em diversos experimentos *in vitro* e *in vivo*. NASER *et al.* em 2005, revisou suas propriedades fitoquímicas, demonstrando potenciais antiviral e imunofarmacológico. Polissacarídeos dessa planta mostraram inibir a atividade dos vírus HIV (human immunodeficiency virus) e de influenza tipo A, co-estimulação e efeitos sobre citocinas, a produção de anticorpos e ativação de

células imunocompetentes e macrófagos. Os efeitos *in vitro* foram observados com doses ponderais (diluções baixas) do extrato da planta e de seus princípios ativos. Apesar de todos os estudos mostrando atividades eficazes com a *Thuja occidentalis*, o seu uso na medicina é moderado devido a propriedades tóxicas do seu óleo, chamado Tujona.

Hoje em dia, é muito usada na fitoterapia e na medicina homeopática (SHEALY, 1999; NASER *et al.*, 2005). A tintura-mãe é preparada a partir de macerados de suas folhas aromáticas e ramos até formar uma polpa que serve para confeccionar o medicamento homeopático (SHEALY, 1999). Compostos fitoterápicos, como Esberitox® contendo *Thuja occidentalis* são usados para tratar resfriado e auxiliar ao tratamento de infecções bacterianas (HAUKE, *et al.*, 2002). Na medicina popular, *Thuja occidentalis* tem sido usada para tratar catarro brônquico, cistite, psoríase, carcinoma do útero, amenorréia e reumatismo (CHANG, *et al.*, 2000).

Matéria médica:

Ela apresenta uma extensa patogenesia, contudo é principalmente indicada em dores de cabeça e nevralgias intensas (SHEALY, 1999), infecções com presença de catarro, verrugas, pólipos nasais e uterinos, gonorréia agudas e crônicas (TOLEDO, 1910; SHEALY, 1999).

Bryonia alba

É uma planta trepadeira que cresce em toda Europa, suas raízes são enormes e armazenam muita água (HAYFIELD, 1999). O grego Hipócrates foi um dos primeiros médicos que utilizou a Bryonia, no século V a.C. Os romanos também a utilizaram para tratar paralisia, gota e epilepsia. A planta tem uma raiz amarga que quando ingerida pode causar a morte em questão de horas (SHEALY, 1999). Foi um dos primeiros medicamentos provados por Hahnemann (MARKS, 1997). A tintura-mãe desta é a planta é feita a partir de sua raiz fresca, a qual é obtida amassando-se a raiz até virar uma massa (SHEALY, 1999).

Matéria médica:

A *Bryonia alba* é bem conhecida na homeopatia por suas atividades anti-reumática e expectorante (TOLEDO, 1910; KRAUZE-BARANOWSKA; CISOWSKI, 1995).

No Brasil a homeopatia deixou de ser considerada terapia alternativa quando foi reconhecida como especialidade médica pela portaria nº 1000 de 1980 pelo Conselho Federal de Medicina (NOGUEIRA *et al.*, 1986).

Entender o mecanismo de ação da homeopatia tem sido um obstáculo para esse sistema terapêutico desde seus primórdios. O problema tornou-se ainda mais difícil com o advento da era científica, quando observou-se que parte dos efeitos drásticos relatados era em resposta ao uso de preparados tão diluídos que eram quimicamente semelhantes a substâncias inertes. Em termos bioquímicos é convencionalmente entendido como atuam as drogas convencionais, porém, a partir de então, a homeopatia apresenta um enorme desafio intelectual, se não um completo impasse. Muitos cientistas têm sugerido que os efeitos clínicos dos medicamentos homeopáticos são devidos apenas ao efeito placebo. Entretanto, estudos rigorosos, com replicatas de forma duplo-cegas e aleatórias, têm mostrado diferenças significativas entre homeopatia e placebo, visando um melhor entendimento da homeopatia (JONAS, JACOBS; 1996; VICKERS; ZOLLMAN, 1999; MATHIE, 2003).

Alguns dos primeiros experimentos laboratoriais com diluições homeopáticas muito baixas foram realizados por um proeminente patologista britânico, William Boyd, que realizou uma série de experimentos laboratoriais na década de 30, demonstrando os efeitos dos preparados homeopáticos do elemento mercúrio nos padrões de crescimento do lêvedo (JONAS; JACOBS, 1996). Desde então, alguns pesquisadores têm submetido suas pesquisas para verificar tanto a ação de substâncias altamente diluídas, como de medicamentos homeopáticos. Dentre estes, vários são voltados para o estudo em células do sistema imunológico e inflamação, como revisado por Bellavite, *et al.* (2006). Além de substâncias simples altamente diluídas, alguns compostos homeopáticos também estão sendo estudados e publicados em revistas de grande relevância. FMS*Calciumfluor, por exemplo, solução que contém CaF_2 , MgHPO_4 e SiO_2 , apresenta resultados relacionados a promoção da osteogênese e da modulação dos níveis de expressão de mRNAs de marcadores osteogênicos (PALERMO, *et al.*, 1999; MANDUCA, *et al.*, 2005). Engystol-N[®], composto de *Vincetoxicum* e enxofre, estimulam a secreção de citocinas de linfócitos T e inibe a produção de ânion superóxido (O_2^-), e possui atividade antiviral (FIMIANI, *et al.*, 2000; OBERBAUM, *et al.*, 2005). O Laboratório de

Pesquisa em Células Inflamatórias e Neoplásicas da UFPR, desde 1998 vem encontrando resultados relevantes pesquisando medicamentos complexos homeopáticos (CHIs), os quais não apresentam toxicidade e nem mutagenicidade em ensaios citogenéticos (SELIGMANN *et al.*, 2003). Dentre estes estudos destacam-se os seguintes resultados: 1) estudos com macrófagos peritoneais de camundongo - diminuição da produção do fator de necrose tumoral (TNF- α) *in vitro* (PIEMONTE; BUCHI, 2002); o aumento tanto da atividade enzimática da NADPH oxidase foi quanto da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (OLIVEIRA *et al.*, 2006); aumento da atividade do sistema endosomal/lisosomal assim como da atividade fagocítica dos macrófagos em interação com *Saccharomyces cerevisiae* e *Trypanosoma cruzi* epimastigotas (LOPES *et al.*, 2006); alterações na expressão de diversos genes através da análise da expressão gênica de macrófagos tratados (OLIVEIRA *et al.*, 2008); remissão de 30% dos tumores sarcoma 180 dos camundongos, significante redução do volume tumoral dos tumores que permaneceram. Aumento da infiltração leucocitária, granulação tecidual e fibrose circundante ao tumor. Aumento do número total de leucócitos, especialmente os linfócitos T, onde houve aumento proporcional de células T helper (Th), linfócitos B e células natural killer (NK), sugerindo uma ação direta ou indireta na hematopoiese (SATO *et al.*, 2005). Estudos *in vitro* e *ex vivo* com células de medula óssea foram realizados, os quais mostraram que linhagem monocítica (CD11b+) e as células estromais foram ativadas pelo tratamento (ABUD *et al.*, 2006; CESAR *et al.*, 2008; CESAR *et al.*, 2009). Atualmente nosso grupo de pesquisa trabalha com cinco diferentes CHIs e medicamentos homeopáticos únicos, com diferentes modelos experimentais. Nossos últimos trabalhos publicados descrevem propriedades antitumorais de alguns dos complexos. Linfócitos co-cultivados com macrófagos na presença do complexo imunomodulador (CHI) aumentaram a capacidade de destruir células de melanoma (GUIMARÃES, *et al.*, 2009) e um complexo homeopático (M8 mostrou propriedades anticâncer *in vitro* e *in vivo* (GUIMARÃES, *et al.*, 2010)

Várias são as hipóteses para explicar o mecanismo de ação da homeopatia. Essas incluem teorias baseadas no comportamento complexo de sistemas dinâmicos, mecânica quântica, teoria da informação e até parapsicologia e mágica. Faz-se necessário pesquisas melhores e em maior número, livres de crenças ou

descrenças no sistema em questão (JONAS, KAPTCHUK E LINDE, 2003). Talvez nossos pensamentos tenham sido dominados pela linearidade dos modelos derivados da farmacologia convencional. E sendo assim, nós podemos estar procurando por efeitos como na medicina alopática, ou pior, estamos apenas satisfeitos com esses tipos de efeitos (FISHER, 2003).

Sistema imunológico

Tratamentos homeopáticos modulam o sistema imunológico e freqüentemente resultam em redução de doenças infecciosas e inflamatórias (PEDALINO, 2004). O sistema imunológico é uma rede integrada de órgãos linfóides, células e citocinas. Sua principal função é a defesa do organismo, sendo assim, um desequilíbrio do sistema imunológico pode resultar no aparecimento de diversos tipos de doenças. Em caso de baixa atividade, podem aparecer infecções. Já se esse sistema tiver uma atividade exacerbada, pode gerar alergias e doenças autoimunes (PARKIN; COHEN, 2001).

Tradicionalmente, as ações do sistema imunológico são divididas em resposta/imunidade inata e adaptativa, determinadas pela velocidade e especificidade da reação. Essas respostas imunológicas são estimuladas em reação a ameaças contra a saúde. Nos animais, a defesa contra agentes infecciosos, particularmente o crescimento rápido de vírus e bactérias, exige uma resposta imediata do sistema imunológico do hospedeiro (inata), a fim de limitar o seu crescimento e a disseminação, e, em seguida, a estimulação de uma resposta prolongada e específica para efeito de imunização e prevenção de uma re-infecção (resposta adaptativa) (MURTAUG, 2002).

A imunidade inata representa a primeira linha de defesa interna contra o "perigo", como por exemplo, corpos estranhos, especialmente os microorganismos. Essa primeira defesa inclui barreiras químicas, físicas e microbiológicas. No entanto, uma vez rompidas, o organismo necessita de um sistema mais ativo de proteção, o qual engloba os elementos do sistema imunológico (neutrófilos, monócitos, complemento, citocinas e proteínas de fase aguda), que fornecem defesa imediata do hospedeiro. É aquela imunidade presente em recém nascidos. A natureza altamente conservada dessa resposta, que é vista até nos animais mais simples, confirma a sua importância para a sobrevivência. (PARKIN; COHEN, 2001). A

resposta inata é mediada por um grande número de interações entre receptores de reconhecimento padrão (PRR-patterns recognition receptors), que são considerados primitivos, pois são encontrados até mesmo em organismos invertebrados, e agentes patogênicos associados a um padrão de moléculas reconhecidas por células da imunidade inata. As células que medeiam essa imunidade têm um programa específico, assim como o programa de receptores de reconhecimento a agentes invasores (BOWDISH, *et al.*, 2007).

Imunidade adaptativa é a marca dos animais mais complexos. É adquirida no decorrer da vida. Essa resposta consiste em reações antígeno-específico através do rearranjo somático de células B e receptores de células T. Esta reprogramação confere especificidade para um antígeno ou epítipo, através, por exemplo, de anticorpos. A resposta adaptativa tem memória, de modo que uma posterior exposição com o mesmo antígeno ou similar, leva a uma resposta mais enérgica e rápida (PARKIN; COHEN, 2001; BOWDISH, *et al.*, 2007). Embora essa especificidade deva ser estendida estritamente a antígenos ou patógenos relacionados, a consequência de ter potentes efetores, como anticorpos e respostas mediadas por células T, é que a reatividade cruzada com algum componente do próprio organismo, pode levar a condições graves, como a autoimunidade (BOWDISH, *et al.*, 2007). As interações entre as imunidades são bidirecionais. Evidentemente, os dois tipos de respostas são complementares. Como resultado da ação das células envolvidas na primeira linha de defesa (local da resposta inflamatória) parte dos antígenos reconhecidos pela imunidade inata é apresentado por uma célula apresentadora de antígenos (APC) á linfócitos T que interagem com o antígeno apresentado, dando início à ativação da resposta imunológica adaptativa (PARKIN; COHEN, 2001).

A resposta adaptativa pode ainda ser dividida em resposta celular ou humoral. Linfócitos T CD4⁺ são conhecidos usualmente como linfócitos T “helper” por possuírem funções de interação e ativação de outras células imunitárias de modo a direcionar e fortalecer respostas imunitárias específicas como Th1, Th2 ou Th3. A resposta Th1 é mediada por linfócitos T em perspectiva celular, sendo dirigida principalmente por linfócitos T CD8⁺ e NK ativados por IL-2 e IFN- γ secretadas por linfócitos T CD4⁺ ativados. A resposta Th2 é a resposta humoral, sendo dirigida por linfócitos B que secretam imunoglobulinas para neutralizar patógenos em lugares

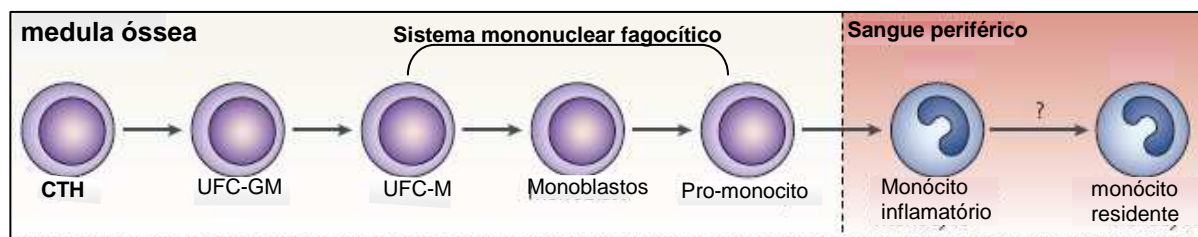
distantes do organismo. Os linfócitos B são ativados nesta via por citocinas como IL-4 e IL-5 produzidas por linfócitos Th2 ativados (JANEWAY *et al.*, 2007). Ambas as respostas Th1/Th2, dependem da influência do linfócito T CD4+ para promover a ativação e efetividade das células que executarão a resposta. A resposta Th3, ou Treg (regulatória), foi descrita recentemente como sendo a resposta imunoregulatória por linfócitos T CD4+ diferenciados, que irá reduzir ou neutralizar a resposta imunitária que estiver ocorrendo por outras células como macrófagos, neutrófilos, linfócitos T CD8+ e NK. O linfócito Th3 tem se mostrado promissor em estudos de imunoterapia nas doenças auto-imunes onde o sistema imunitário esteja estimulado cronicamente, ou seja, mais que o necessário (VOJDANI; ERDE, 2006; JANDUS *et al.*, 2008).

Embora essa divisão generalizada possa ser extremamente útil, deve-se sempre considerar que há um componente “adaptativo” da resposta imunológica inata, o qual aumenta significativamente o repertório de respostas e reconhecimento e pode pelo menos parcialmente, superar as limitações genéticas inerentes a resposta imunológica inata. Diversos estudos na literatura mostram que infecções e estímulos inflamatórios podem levar a uma duradoura (mas possivelmente não permanente) mudanças nas propriedades das células imunológicas, especificamente, aumento na expressão de receptores de macrófagos, e que essas mudanças podem levar a um aumento da imunidade para os desafios seguintes (BOWDISH, *et al.*, 2007).

Macrófagos

Macrófagos são um grupo heterogêneo de células do sistema imunológico com diversas funções e fenótipos conforme o estado de ativação e localização. Apesar de ser considerado um componente inato, possuem importante papel na imunidade inata e adquirida (celular e humoral) e estão claramente envolvidas nas respostas pró e antiinflamatórias (GORDON, 1999; BOWDISH, *et al.*, 2007). Eles possuem origem no sistema mononuclear fagocítico o qual é definido como uma linhagem de células hematopoiéticas derivadas de células progenitoras mielóides (precursor comum com neutrófilo) da medula óssea (HUME, 2006). O crescimento e diferenciação dos monócitos dependem da presença de citocinas determinadoras de linhagem, como o fator estimulador de colônia de granulócitos/macrófagos (GM-

CSF), o fator estimulador de colônia de monócitos/macrófagos (M-CSF) e de interações com o estroma medular (GORDON, 2003). Essas células, uma vez diferenciadas em monócitos, são liberadas no sangue periférico, onde circulam por vários dias antes de entrar em tecidos e reabastecer a população de macrófagos teciduais (FIGURA 2).



Monócitos se originam na medula óssea a partir de células tronco hematopoiéticas (CTH). Passam por etapas de diferenciação na qual se comprometem a linhagem mielocítica e monocítica. Em resposta a fatores de crescimento se diferenciam em monoblastos e pró-monócitos, antes de se tornarem monócitos, os quais saem da medula e entram na corrente sanguínea. Dependendo do estímulo, eles podem rapidamente sair da circulação e ir para locais de resposta inflamatória (monócito inflamatório), ou mais lentamente antes de irem para os tecidos específicos (monócitos residentes). (UFC-GM – unidade formadora de colônia de granulócito-macrófago; UFC-M unidade formadora de colônia de monócito/macrófago).

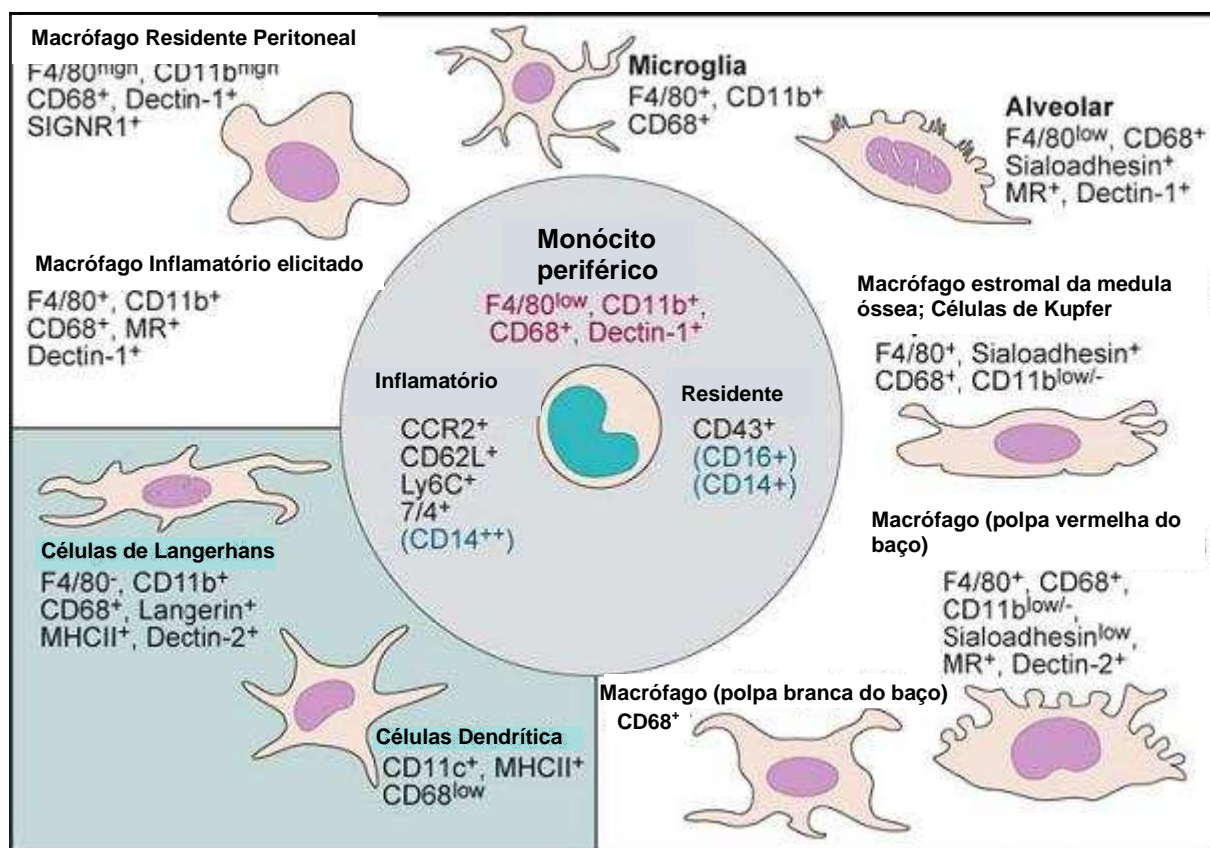
FIGURA 2- ORIGEM DOS MONÓCITOS

FONTE: adaptado de MOSSER; EDWARDS (2008)

Estímulos pró-inflamatórios, metabólicos e imunológicos causam recrutamento de monócitos aos tecidos periféricos, onde ocorre uma diferenciação destas células em macrófagos e células dendríticas, os quais recebem nomes específicos de acordo com a função e o local em que se encontram (FIGURA 3) (HUME, 2006; GORDON; TAYLOR, 2005; VAN FURTH, 1973).

A população de macrófagos residentes em diferentes órgãos – como macrófagos peritoneais (peritônio), células de Kupfer (fígado), microglia (sistema nervoso central) – adaptam-se ao seu microambiente. Os sinais responsáveis pelo fenótipo do macrófago, específico em cada tecido, incluem produtos secretados, da superfície de células vizinhas e da matriz extracelular (GORDON, 2003).

Macrófagos estão espalhados por todo o organismo. Eles constituem cerca de 10-15% das células totais do corpo. Esses fagócitos mononucleares têm pelo menos 3 funções: apresentação de antígeno, fagocitose (defesa e eliminação de debris celulares) e imunomodulação (DALE, *et al.*, 2008).



Antígenos entre parênteses correspondem a células humanas, todos os demais a estudos de células murina.

FIGURA 3 – HETEROGENEIDADE DE MONÓCITOS/MACRÓFAGOS DURANTE DIFERENCIAÇÃO *IN VIVO*

FONTE: adaptado de TAYLOR, *et al.* (2005)

Macrófagos têm notável plasticidade que os permite responder eficientemente a mudanças no ambiente com mudanças em seu fenótipo, e sua fisiologia pode ser sensivelmente alterada por respostas imunológicas inatas e adaptativas (MOSSER; EDWARDS, 2008). Estes estímulos ativam macrófagos e modulam a expressão de seus receptores de superfície, fazendo com que essas células modifiquem algumas de suas propriedades tais como: crescimento, diferenciação, migração, secreção, habilidade para aderir e espalhar-se em substratos, taxa de endocitose e fusão de lisossomos com vacúolos endocíticos e adquiram uma grande capacidade de matar microrganismos e células tumorais através, por exemplo, de mecanismos oxigênio e/ou nitrogênio dependentes (ROS e RNS, respectivamente) (VENKATA-REDY; GANGADHARAN, 1992; WOOD; AUSTYN, 1993; GORDON, 2003). As funções de citotoxicidade contra tumor podem ser estimuladas com produtos das paredes de bactérias, como LPS, ou citocinas como IFN- γ e GM-CSF. Macrófagos podem

realizar suas funções de defesa de uma forma direta, envolvendo a liberação de produtos, tais como NO e TNF- α que são prejudiciais para os microorganismos e células cancerosas. Ou ainda podem desempenhar estas funções antimicrobiais e antitumorais de uma maneira indireta, através da secreção de citocinas e processamento e apresentação de antígeno, regulando o sistema imunológico (KLIMP, *et al.*, 2002)

Exemplo importante da estimulação dos macrófagos é a ligação de receptores padrão, como os receptores de manose (CD206) e Dectin-1, aos patógenos associados a moléculas padrão de reconhecimento. Esses receptores fazem parte da superfamília de receptores padrão de reconhecimento, lectina tipo C, que consiste em receptores solúveis e acoplados a superfície e são essenciais tanto para o reconhecimento do patógeno quanto para interação célula-célula (BOWDISH, *et al.*, 2007). São expressos em monócitos/macrófagos e células dendríticas. Liga-se a um grande número de microorganismos, como *Candida albicans*, *Leishmania donovani*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumonia* e *Saccharomice cerevisae*. Esse receptor reconhece β -glucana, manose, fucose, ou resíduos N-acetilglucosamina sobre a superfície desses microorganismos. A ligação desses receptores aos microorganismos alvos dispara sinais intracelulares resultando em uma variedade de respostas celulares como fagocitose e subsequentemente a produção de citocinas pro inflamatórias, ativação de células T, polarização para a expressão de receptores de resposta Th1 e produção de espécies reativas (KERRIGAN; BROWN, 2009), fazendo a ligação entre a imunidade inata e adaptativa.

Estas alterações funcionais de fenótipo, como resultado do estímulo das diferentes condições do ambiental e da ligação receptor-antígeno, servem para considerar o macrófago como um componente adaptativo do sistema imunológico inato. Além do seu papel de efetor e fundamental na imunidade inata, macrófagos mobilizam linfócitos para a elaboração da resposta celulares antígeno específico/humoral, que fornecem proteção sustentada contra patógenos intracelulares e extracelulares (BOWDISH, *et al.*, 2007; GORDON, 1999). Macrófagos podem alterar a resposta imunológica inata através da sua estimulação por diversos meios, entre eles citocinas e produtos microbiais (TAYLOR, *et. al.*, 2005). Os macrófagos estimulados secretam citocinas que influenciam a

diferenciação de células T e ativam células T helper (Th). As citocinas presentes durante a expansão de células T influenciam a capacidade das células Th de se diferenciar em células Th1, Th2 e Th3 (TRINCHERI 1997; PATTERSON 2004; JANEWAY *et al.*, 2007).

Em um esforço para imitar a divisão presente na literatura a respeito das células T, os macrófagos foram classificados com o que poderia ser visto como uma escala linear, na qual os macrófagos “ativados classicamente” representam um extremo e macrófagos “ativados alternativamente” representam o outro. No entanto, as características de um muitas vezes se misturam com os do outro. Tanto que os autores entrem em conflito quanto as suas divisões e classificações. Neste trabalho, optaremos pela divisão em macrófagos ativados classicamente ou alternativamente, no entanto, sem esquecer que esta classificação não é estática.

O termo “macrófagos ativados classicamente” é usado para designar o macrófago efetor que é produzido durante uma resposta imunológica mediada por célula ou Th1. É ativado através citocinas, como INF- γ , produzidas durante a resposta imunológica celular ou humoral. Estas células ativadas classicamente apresentam um aumento na produção de espécies reativas e consequentemente um aumento na morte de microorganismos intracelulares e produção de espécies reativas, aumento na secreção de citocinas e mediadores da inflamação, e alta expressão de moléculas co-regulatórias. Macrófagos classicamente ativados são componentes vitais para a defesa do hospedeiro, mas suas ações devem ser altamente controladas para que se evitem danos ao tecido, como o desenvolvimento de doenças autoimunes. (MOSSER; EDWARDS, 2008).

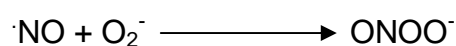
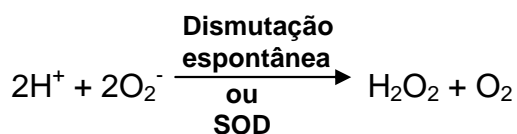
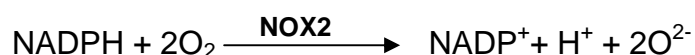
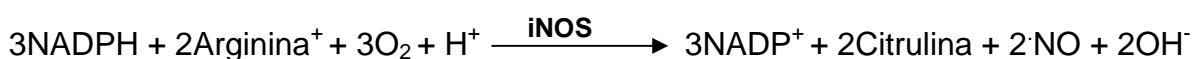
Macrófagos ativados alternativamente são aqueles ativados por citocinas IL-4 ou IL-13, citocinas que normalmente são produzidas durante uma resposta Th2, particularmente durante alergias ou respostas celular ou humoral a infecções de parasitas. Esses macrófagos alternativamente ativados têm um importante papel na proteção do hospedeiro por diminuir a inflamação, através da produção de citocinas que inibem a ação das citocinas inflamatórias, protegendo o organismo contra uma possível doença autoimune além de promover o reparo tecidual. Aumenta a expressão de receptores da imunidade inata, a apresentação de antígeno (aumenta MHCII) receptor pra manose e receptor pra IL-4. (MOSSER; EDWARDS, 2008; VARIN; GORDON, 2009).

Macrófagos podem ainda ter uma ativação inata ou humoral. A ativação inata ocorre através de estímulos microbiais que se ligam aos receptores padrão de reconhecimento, como receptor de manose. Este estímulo faz com que ocorra um aumento na produção de espécies reativas e citocinas pró-inflamatórias, como INF- α e β , seguido de uma regulação antiinflamatória através da liberação de citocinas. Um aumento na expressão de moléculas co-estimulatórias favorece a apresentação de antígeno. A ativação humoral pode acontecer a partir da ligação de moléculas no receptor Fc e sistema complemento, resultando numa atividade citolítica do macrófago e também na produção de citocinas pró e/ou antiinflamatórias (GORDON, 2003).

Espécies reativas do oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS)

Células fagocíticas respondem a uma variedade de estímulos de membrana via a produção e liberação de um número de espécies reativas (SASSADA, *et al.*, 1983). ROS incluem ânion superóxido (O_2^-), hidroxila (OH), e outros radicais e não radicais que são agentes oxidantes e/ou facilmente conduzidos a radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (CADENAS; CADENAS, 2002) e RNS integram espécies como Óxido Nítrico (NO) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (FORMAN; TORRES, 2001). O papel das ROS e RNS produzidas pelo “burst oxidativo” é de atuar na defesa do organismo, sinalizadores intercelular e como segundos mensageiros nas vias de sinalização de macrófagos (NYGREN *et al.*, 2001; FORMAN; TORRES, 2001; RETH, 2002)

Abaixo se encontram algumas reações que dão origem a ROS e RNS, segundo FORMAN; TORRES, 2001



O óxido nítrico (NO) é usado por células de todo reino animal como um agente sinalizador ou tóxico. No sistema imunológico, é gerado durante respostas imunológicas e inflamatórias por diversos tipos celulares. Possui diversos papéis na imunidade: agente tóxico em direção a organismo infeccioso (potenciais antiviral e antimicrobial), potencial antitumoral, indutor ou supressor da apoptose, ou imunoregulador (COLEMAN, 2001; CADENAS; CADENAS, 2002; PALUDAN *et al*, 1999). NO é uma molécula reguladora incomum, pois não possui um receptor na superfície da célula, ele atravessa a membrana celular indiscriminadamente. Seu único elétron desemparelhado o torna um radical, portanto, quimicamente ativo, mas para um radical é relativamente estável. NO pode possuir efeitos diretos e indiretos sobre seus alvos. Diretos são aqueles em que NO interage diretamente com a molécula biológica ou outro alvo e indiretos são aqueles que ele age através de intermediários derivados do NO, como ONOO⁻. A interação do NO com proteínas contendo metais e com radicais orgânicos livres, são bons exemplos do efeito direto (GRISHAM, *et al.*, 1999).

Em macrófagos ativados, NO é produzido por uma isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), a qual converte L-arginina a L-citrulina com a formação de NO. Vários fatores podem ativar iNOS, como LPS, TNF- α , IFN- α , a qual é expressa e está continuamente ativa durante a inflamação (CADENAS; CADENAS, 2002; PALUDAN *et al*, 1999). O NO liberado por macrófagos pode também ativar o fator nuclear de transcrição NF- κ B, cuja a ativação é essencial para a expressão de um grande número de citocinas e genes de adesão que são mediadores críticos para reação inflamatória (BRUCKDORF, 2005; COLEMAN, 2001; FORMAN; TORRES, 2001).

O ânion superóxido (O₂⁻) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) são gerados enzimaticamente por oxirredutase ou não enzimaticamente, como subprodutos de reações que utilizam transferência de elétrons, como as que ocorrem na mitocôndria (FORMAN; TORRES, 2001). Em células fagocíticas, há uma grande fonte de O₂⁻, o qual é produzido pelo complexo enzimático NADPH oxidase (NOX) associado à membrana, que catalisa a redução do oxigênio usando NADPH como um doador de elétrons. NOX2, a subunidade catalítica da NOX em fagócitos, está localizada na membrana plasmática de lamelipódios e em fagossomos. Após ser estimulada, ocorre uma ativação da NOX2 que pode produzir O₂⁻ intra (dentro dos fagossomos)

e extracelularmente (CROSS; SEGAL, 2004; BROWN; GRIENDLING, 2009). Essa oxidase está normalmente dormente, mas pode ser rapidamente ativada por vários estímulos. Entre eles estão os agonistas que interagem com receptores específicos na superfície celular de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos, como partículas opsonizadas e cadeias de peptídeos imaturas de microrganismos, e também agonistas de proteína quinase C como o PMA (phorbol myristate acetate) (SEGAL; ABO, 1993). O O_2^- produzido é altamente reativo e possui vida curta. Ele não é capaz de difundir-se através da membrana biológica, mas pode atravessá-la por canais. A produção de O_2^- por macrófagos é crítica para a defesa do organismo. A natureza citotóxica do O_2^- e das moléculas provenientes das suas interações contribuem não somente para a morte de organismos invasores, como também no dano tecidual e na inflamação (XIA; ZWEIER, 1997).

As interações químicas e biológicas de NO e ROS com várias moléculas biológicas têm importantes consequências sobre diferentes mecanismos imunológicos e patológicos (SASSADA, *et al.*, 1983). Em células que produzem tanto O_2^- quanto NO ocorre a reação, perto do limite de difusão ($6,7 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), entre essas duas moléculas, resultando na formação do peroxinitrito ($ONOO^-$) ($NO + O_2^- \rightarrow ONOO^-$) (FORMAN; TORRES, 2001; NATHAN; SHILOH, 2000).

Superóxido pode se dismutar espontaneamente e rapidamente a H_2O_2 ou enzimaticamente via superóxido dismutase (SOD). A maior fonte de H_2O_2 de uma célula surge através da dismutação espontânea do O_2^- , a qual é uma reação mais rápida que aquela que ocorre através da SOD. H_2O_2 é mais estável que O_2^- e também pode atravessar membrana, provavelmente pelos mesmos canais da água. Ele não é um radical, porém pode reagir com sítios específicos, como metais. (BRONW; GRIENDLING, 2009; NATHAN; SHILOH, 2000). Apesar do peróxido de hidrogênio ser mais conhecido por seus efeitos citotóxicos, nos últimos anos, ficou estabelecido como um importante regulador da transdução de sinal em eucariotos (VEAL, *et al.*, 2007).

Medula óssea

Todas as células do sistema imunológico têm origem na medula óssea, a partir de células tronco-hematopoiéticas. A medula óssea vermelha esta presente em ossos como o esterno, íliaco e fêmures, é altamente vascularizada e permite a

proliferação e diferenciação das células pluripotentes (MÜLLER-SIEBURG; DERYUGINA, 1995). A medula óssea (MO) é uma fonte permanente de células-tronco adultas e possui duas populações discretas de células-tronco: as mesenquimais e as hematopoiéticas (CTH). As células-tronco mesenquimais encontram-se imersas no estroma medular, e podem se diferenciar em diversos tipos celulares, como adipócitos e osteoblastos. (KORBLING; ESTROV, 2003). O estroma tem a função de suporte funcional para o processo de hematopoiese, através do fornecimento de um microambiente único que fornece moléculas de crescimento regulatório, influencia a diferenciação, sobrevivência, proliferação, maturação e promove interações célula-célula e célula-matriz extracelular. A complexa composição do tecido estromal medular compreende uma população heterogênea de células, como adipócitos, células reticulares, osteogênicas, endoteliais, células musculares em paredes de vasos e macrófagos (KONDO, *et al.*, 2003 ; IMADA *et al.*, 2005)

As células hematopoiéticas dão origem às células sanguíneas que podem ser classificadas em duas principais classes: células linfóides (linfócitos T, B e NK) e células mielóides (granulócitos, monócitos, megacariócitos e eritrócitos). A expressão de diferentes receptores na superfície dos progenitores hematopoiéticos permite a sua interação com vários elementos reguladores presentes no ambiente, nos quais se incluem as células estromais, as moléculas de matriz extracelular e citocinas regulatórias, como fatores de crescimento e diferenciação (GUNSILIUS, *et al.*, 2001). Os granulócitos, linfócitos e monócitos circulam no sangue em um estado quiescente de baixa adesividade, antes de migrarem aos tecidos, participando nas funções imunológicas e no reparo tecidual (HARRIS *et al.*, 2000). A expressão das integrinas de superfície de leucócitos pode ocorrer através de uma nova biosíntese dessas moléculas, o que é altamente regulado e geralmente está envolvida com a diferenciação de células imunológicas. Ou a partir da regulação dessas proteínas já formadas, que ficam estocadas no citoplasma. Esta última, esta envolvida com respostas rápidas da célula em relação a mudanças no meio, como por exemplo, uma infecção ou inflamação, portanto, contribuindo para a reposta celular (KISHIMOTO, 1990; ZDOSEK, *et al.*, 2007).

As integrinas Mac-1 (macrophage antigen-1) ou CR3b (receptor do complemento tipo 3) e p150,95 (também chamado receptor complemento tipo 4) ou

Leu M5 são glicoproteínas heterodiméricas ($\alpha\beta$) de adesão dos leucócitos. As subunidades α , distintas nessas duas integrinas, foram designadas como CD11b em Mac-1 e CD11c em p150,95. A subunidade β homóloga é chamada de CD18 (KISHIMOTO, *et al.*, 1990; HARRIS *et al.*, 2000). Mac-1 e p150,95 são receptores multifuncionais e estão diretamente envolvidos na adesão e migração celular. Estão evolutivamente relacionadas aos receptores integrinas que medeiam adesão celular à matriz extracelular durante o desenvolvimento e reparo tecidual. Ambas integrinas são expressas em monócitos, macrófagos, células dendríticas, polimorfonucleares e células Natural Killers. O que varia é a quantidade relativa dessas integrinas conforme o tipo de célula e seu estado de ativação ou diferenciação (ARNAOUT, 1990; GEORGAKOPOULOS; *et al.*, 2008). Nas CTHs, Mac-1 e p150,95 não estão presentes nas unidades formadoras de granulócitos e monócitos, mas são as primeiras detectadas durante a diferenciação de monócitos e granulócitos nos estágios mielocíticos e monoblásticos (ARNAOUT, 1990; KISHIMOTO *et al.*, 1990, YANG, *et al.*, 2007). Mac-1 é essencial para a célula ligar-se ao receptor complemento, espalhar-se e mediar a fagocitose. Além de ser responsável pela adesão a fibronectina, ao plástico e ao vidro, morte celular, quimiotaxia e ativação celular e ligar-se a ICAM-1 (ARNAOUT, 1990; KISHIMOTO, 1990; COUGOULE, *et al.*, 2004; GEORGAKOPOULOS, *et al.*, 2008; YANG, *et al.*, 2007).

3 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de terapias capazes de modular o processo de cura de doenças, sem suprimir os efeitos desejáveis dos aspectos fisiológicos do sistema imunológico, deve ser uma alternativa interessante para obter uma melhor eficácia da resposta do tecido contra a agressão exógena. Ao contrário das drogas utilizadas pela medicina alopática, que atuam diretamente sobre os processos fisiológicos relacionados com os sintomas da doença, os medicamentos homeopáticos promovem a melhora do estado geral de saúde do indivíduo, estimulando seu sistema imunológico a desencadear respostas adequadas para cada situação. Assim, o tratamento homeopático permite ao indivíduo restabelecer a saúde e prevenir a doença sem, no entanto, produzir os efeitos colaterais experimentados por muitos dos tratamentos convencionais (ULLMAN, 1995).

O uso da homeopatia tem aumentado a cada dia por todas as partes do mundo. Segundo a CONAHON (conselho nacional de homeopatia e fitoterapia) uso da homeopatia é livre em quase 100% dos países onde é usada, como na Índia, EUA, Inglaterra, Canadá, Portugal. Isso passa a ser um problema para a sociedade, uma vez que frente aos resultados prévios do nosso laboratório e revisões da literatura, os medicamentos homeopáticos atuam em todos os tipos de células com os mais variados tipos de resposta. A própria OMS (Organização Mundial de Saúde) mostra-se preocupada com o crescente uso da homeopatia e, em maio de 2002, lançou a primeira estratégia global visando dar suporte no desenvolvimento de políticas nacionais de valorização e regulação das medicinas tradicionais/medicinas alternativas e complementares. Conforme seu "Press Releases WHO/38, de 16 Maio 2002, esclarece que estas terapias estão se tornando mais populares no norte (do planeta) e que mais de 80% das pessoas no sul usam estas terapias nos cuidados básicos de saúde. Apesar disso, em notícia publicada no site do parlamento do Reino Unido em 22 de fevereiro de 2010, o comitê nacional de Ciência e Tecnologia do Reino Unido, conclui que o Serviço Nacional de Saúde deve cessar o financiamento a homeopatia, por considerar que não existem provas científicas da eficácia dos medicamentos e que os ensaios clínicos da homeopatia não são justificados. O comitê se baseia em alguns trabalhos científicos que concluem que a

homeopatia é apenas efeito placebo. A Sociedade Britânica de homeopatia rejeitou os resultados, acusando a comissão de ignorar evidências favoráveis à homeopatia (http://www.parliament.uk/parliamentary_committees/science_technology/s_t_homeopathy_inquiry.cfm)

Com essa nova polêmica, este trabalho mostra-se altamente relevante e urgente de divulgação, pois, estes medicamentos homeopáticos, são medicamentos, e como tais, devem ser estudados e analisados. Uma vez que os medicamentos homeopáticos vem sendo ampla e livremente utilizados pela população em geral, estudos e análises mais específicas de sua forma de ação e seus efeitos sobre o nosso organismo devem ser realizados com seriedade, responsabilidade e urgência, afim de assegurar a população quanto ao seu uso potencial. Devemos lembrar que, assim como na virada do século, a descoberta de agentes infecciosos revolucionou a nossa capacidade de tratar várias doenças, a descoberta do que acontece em nosso organismo com o uso de medicamentos homeopáticos, também podem vir a revolucionar nosso conhecimento de química, biologia e medicina. Se for apenas uma reação ao placebo, ainda oferecerá informações importantes sobre como nossa mente e nosso corpo operam. De qualquer maneira, a exploração de como a homeopatia funciona beneficiaria a ciência moderna (JONAS, JACOBS; 1996).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar o efeito da adição *in vitro* e do tratamento durante 7 dias com substâncias altamente diluídas sobre parâmetros imunitários de macrófagos e células da medula óssea obtidas de camundongos.

4.2 Objetivos específicos

Utilizando substâncias altamente diluídas:

1) Após tratamento *in vitro* de macrófagos peritoneais, detectar e quantificar a liberação de óxido nítrico (NO), de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de ânion superóxido (O₂⁻) com e sem interação macrófagos/leveduras (*Saccharomices cerevisiae*).

2) Após tratamento dos camundongos durante 7 dias detectar e quantificar em análise *ex vivo*:

a. liberação de óxido nítrico (NO), de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de ânion superóxido (O₂⁻) por macrófagos peritoneais.

b. expressão de marcadores hematopoiéticos das membranas de células da medula óssea, utilizando citometria de fluxo.

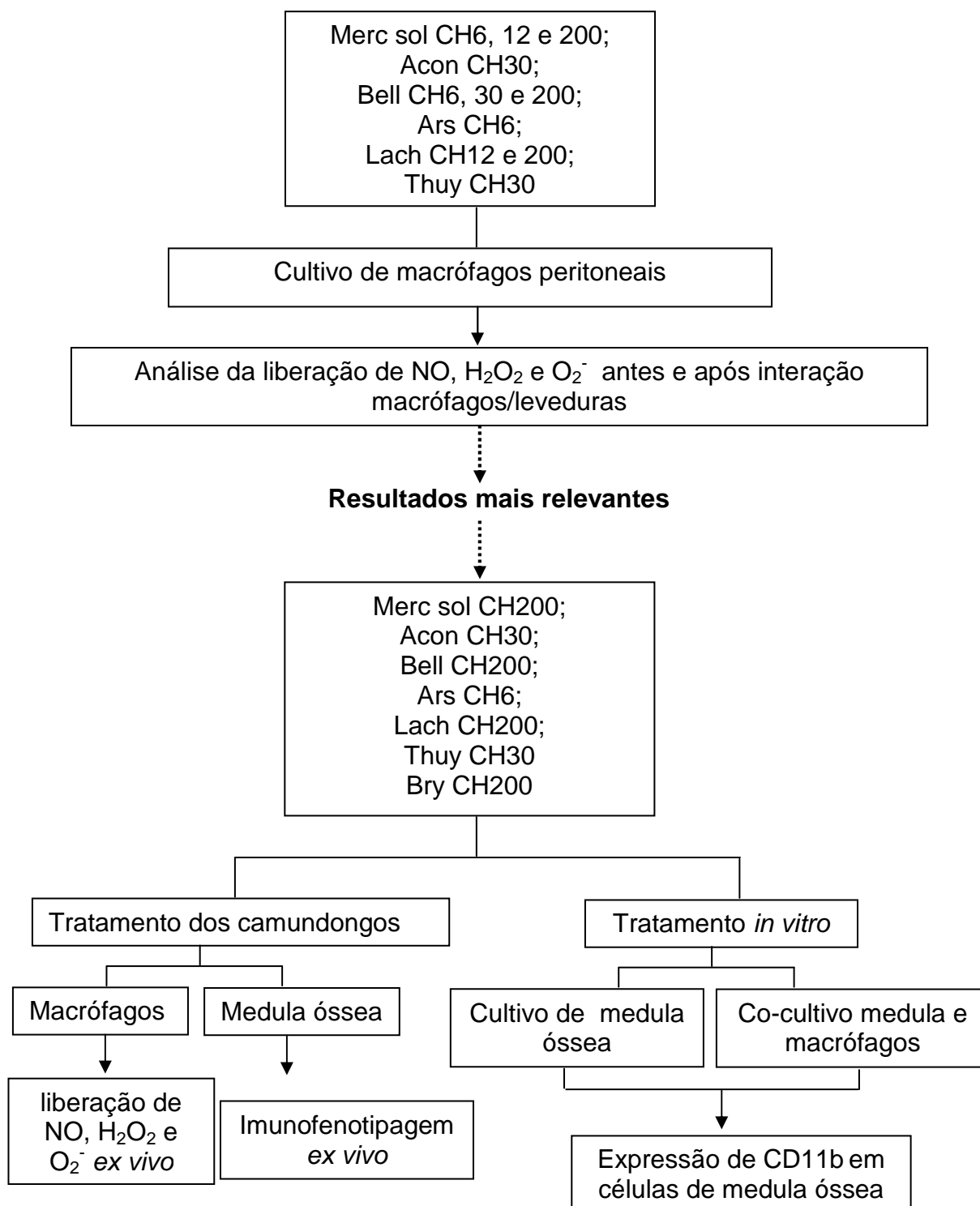
3) após tratamento *in vitro* de co-cultura de macrófagos com células de medula óssea:

a. Avaliar a morfologia dos macrófagos utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV).

b. Avaliar a expressão do marcador de linhagem monocítica CD11b, com detecção e quantificação em citometria de fluxo e visualização em microscópio confocal.

4) após tratamento *in vitro* de medula óssea, avaliar a expressão do marcador de linhagem monocítica CD11b, com detecção e quantificação em citometria de fluxo e visualização em microscópio confocal.

5 MATERIAL E MÉTODOS



Representação esquemática da estratégia metodológica utilizada para realização dos objetivos deste trabalho.

QUADRO 1 – ESTRATÉGIA GERAL DE TRABALHO

5.1 Medicamentos

A seleção dos medicamentos utilizados neste trabalho foi realizada de acordo com a sua indicação na clínica para uso em doenças inflamatória e infecciosas e com efeito demonstrado em trabalho anterior, sobre macrófagos peritoneais de camundongo.

Foram utilizados os medicamentos:

- ✓ *Mercurius solubilis* (Merc sol) CH 6, 12 e 200,
- ✓ *Aconitum napellus* (Acon) CH 30,
- ✓ *Belladonna* (Bell) CH 6, 30 e 200,
- ✓ *Arsenicum album* (Ars) CH 6,
- ✓ *Lachesis muta* (Lach) CH 12 e 200,
- ✓ *Thuya occidentalis* (Thuy) CH 30 e
- ✓ *Bryonia alba* (Bry) CH 200.

Todos manipulados na farmácia Homeoterápica sob a responsabilidade do farmacêutico Narciso da Lozzo Neto CRF-PR 5604. A manipulação seguiu as normas da Farmacopéia Homeopática Brasileira, com dinamizações sucessivas. Todas as succussões foram feitas manualmente. As matrizes dos medicamentos foram adquiridas do Laboratório Schraibmann Ltda – Rua Maria Catur, 208, Carapicuíba, São Paulo (indústria brasileira – CNPJ 62.134.67/0001-00). Tendo como responsável a farmacêutica Tsilia Schraibman – CRF-8 nº7546.

O veículo de diluição dos medicamentos, solução hidroalcoólica a 0,1%, foi preparado da mesma forma que os medicamentos, para que pudesse ser usado como um controle da ação das substâncias altamente diluídas em medicamentos. Todos os medicamentos e a solução hidroalcoólica (HS) receberam códigos, de maneira que o avaliador não soubesse qual solução estava sendo avaliada, configurando assim, uma análise cega.

5.2 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) com mais ou menos 3 meses de idade, pesando entre 25-30g, cedidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas (SCB) da UFPR. Eles receberam ração (Purine®) e água filtrada *ad libitum* e com controle ambiental (25°C) com ciclo claro/escuro de 12 horas. O número de animais utilizados por grupo em cada experimento foi determinado dependendo do número de células necessárias em cada experimento. Todas as

recomendações para manejo científico de animais da lei nacional (Nº 6.638, 5 de novembro de 1979) “Normas para Prática Didático-Científica da Vivissecção de Animais” foram respeitadas. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação em Animal (CEEAA) do SCB da UFPR obtendo o número de certificado 179 (ANEXO 11).

5.3 Células

5.3.1 Macrófagos peritoneais

Para realizar a coleta dos macrófagos peritoneais, seguiu-se o protocolo de rotina baseado em Piemonte; Buchi, (2002) (ANEXO 1). Os camundongos foram mortos por deslocamento cervical. A pele ventral foi rompida para exposição do peritônio. Com uma seringa de 10 ml e agulha estéril, foi injetado na cavidade peritoneal tampão PBS (Phosphate Buffer Solution), pH 7,2, gelado (4°C) e estéril. Após agitar a solução salina no interior do peritônio para que os macrófagos presos na parte interna se soltassem, a solução contendo macrófagos do peritônio (lavado intraperitoneal) foi retirada (aproximadamente 8 ml). O lavado foi transferido para um recipiente estéril e acondicionado no gelo. Ao final da coleta, o *pool* de células foi contado em câmara de Neubauer e microscópio de luz Nikon®.

5.3.2 Células de medula óssea

A obtenção de células da medula óssea de camundongo a partir do fêmur seguiu o protocolo rotineiro do laboratório (ABUD, *et al.*, 2006) (ANEXO 2). Os camundongos foram mortos por deslocamento da coluna cervical. Os fêmures foram retirados, limpos e levados para o fluxo laminar. As epífises foram cortadas e a medula retirada com 2 mL de meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (ANEXO 3). Essa suspensão celular foi centrifugada a 2.800 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 10 ml de meio de cultura. Uma alíquota foi retirada para contagem de células.

Para determinação do número de células obtido, sem a presença de hemácias, foi realizada uma diluição 1:10 (v/v) da suspensão celular obtida na coleta em líquido de Turck - ácido acético 2% (v/v) com violeta genciana - Newprov®. Após a hemólise, foi feita a contagem em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio de luz - Nikon®.

5.4 Cultivo de macrófagos e tratamento *in vitro*

5.4.1 Cultivo de macrófagos

Um *pool* de macrófagos de pelo menos 5 camundongos foi utilizado para cada experimento. Todos os experimentos foram repetidos pelo menos 3 vezes (com quadruplicatas), para cada medicamento. Assim, para cada análise, foram utilizados pelo menos 3 *pools* diferentes de macrófagos. O *pool* de lavado peritoneal foi colocado em tubo de centrífuga de 50 ml, centrifugado a 1500 rpm por 2 min e ressuspenso em 10ml de PBS. Uma alíquota do tubo foi retirada e feita a contagem em câmara de Neubauer. Em fluxo laminar, 5×10^5 células foram colocadas em placas de cultivo da marca TPP®, com 96 poços. As células foram incubadas por 20 min. a 37°C e 5% de CO₂ para a seleção por adesão. O lavado foi retirado, as células aderentes lavadas com PBS a 37 °C e adicionado meio de cultura DMEM (ANEXO 3). As células foram colocadas novamente na incubadora de CO₂, e cultivadas e tratadas por 48 horas.

5.4.2 Tratamento *in vitro* dos macrófagos

Para avaliar a produção e liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) utilizou-se o tratamento *in vitro* das culturas celulares. Para isso, todas as soluções foram filtradas com membrana Millipore® de 0,22µm estéril, acondicionadas em garrafas novas e estéreis e estocadas ao abrigo da luz. Todas as soluções receberam um código.

Código	Substância altamente diluída	Abreviatura	Potência do medicamento
Medicamento D	Sol. hidroalcolica	HS	
Medicamento V	<i>Mercurius solubilis</i>	Merc sol	CH6
Medicamento W	<i>Mercurius solubilis</i>	Merc sol	CH12
Medicamento Z	<i>Mercurius solubilis</i>	Merc sol	CH200
Medicamento K	<i>Aconitum napellus</i>	Acon	CH30
Medicamento Y1	<i>Atropa Belladonna</i>	Bell	CH6
Medicamento Y3	<i>Atropa Belladonna</i>	Bell	CH30
Medicamento Y4	<i>Atropa Belladonna</i>	Bell	CH200
Medicamento Q	<i>Arsenicum album</i>	Ars	CH6
Medicamento N	<i>Lachesis muta</i>	Lach	CH12
Medicamento P	<i>Lachesis muta</i>	Lach	CH200
Medicamento C	<i>Thuya occidentalis</i>	Thuy	CH30

QUADRO 2 – SOLUÇÕES ALTAMENTE DILUÍDAS USADAS PARA O TRATAMENTO *IN VITRO* DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS PARA ANÁLISES DA DETECÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS

Após 2 horas de cultivo adicionou-se 20% de cada medicamento em relação à quantidade de meio. Passadas mais 24 horas foi adicionada dose reforço de 1% em relação ao meio de cada solução. Todos os medicamentos e a solução hidroalcolica, foram sucussionados 15 vezes antes de serem adicionados a cultura (PIEMONTE, 2000) e um grupo sem tratamento, apenas com meio de cultura, foi utilizado como controle dos tratamentos.

5.5 Cultura das células de medula óssea, co-cultura e tratamento *in vitro*.

5.5.1 Cultivo de células de medula óssea

Para calcular o número de animais utilizados para o cultivo de células de medula óssea seguiu-se o mesmo o cálculo descrito para o cultivo de macrófagos. Após a obtenção das células e contagem em câmara de Neubauer, 10^6 células/poço foram colocadas em placas multipoços estéreis e adicionado meio de cultura DMEM. As placas foram mantidas em incubadora a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, durante 96 horas, sem troca de meio e tratadas com os medicamentos conforme anteriormente descrito.

5.5.2 Co-cultura de macrófagos peritoneais com células de medula óssea

Macrófagos e células de medula óssea foram obtidos conforme descrito anteriormente e co-cultivados em placas de co-cultura da marca Costar® de 24 wells/12 transwell com membrana de policarbonato de poros de 0,4µm (FIGURA 5). Na parte superior (separado pela membrana) dos 12 poços de co-cultura existentes nas placas, foram colocados 5×10^5 macrófagos do lavado peritoneal. Após 20 minutos, as células não aderentes foram retiradas junto com o sobrenadante e adicionado meio de cultura DMEM em todos os poços. Na parte inferior dos poços co-cultura, foram colocadas 2×10^6 células de medula óssea e adicionado meio de cultura DMEM. As células foram mantidas em incubadora a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, durante 96 horas.

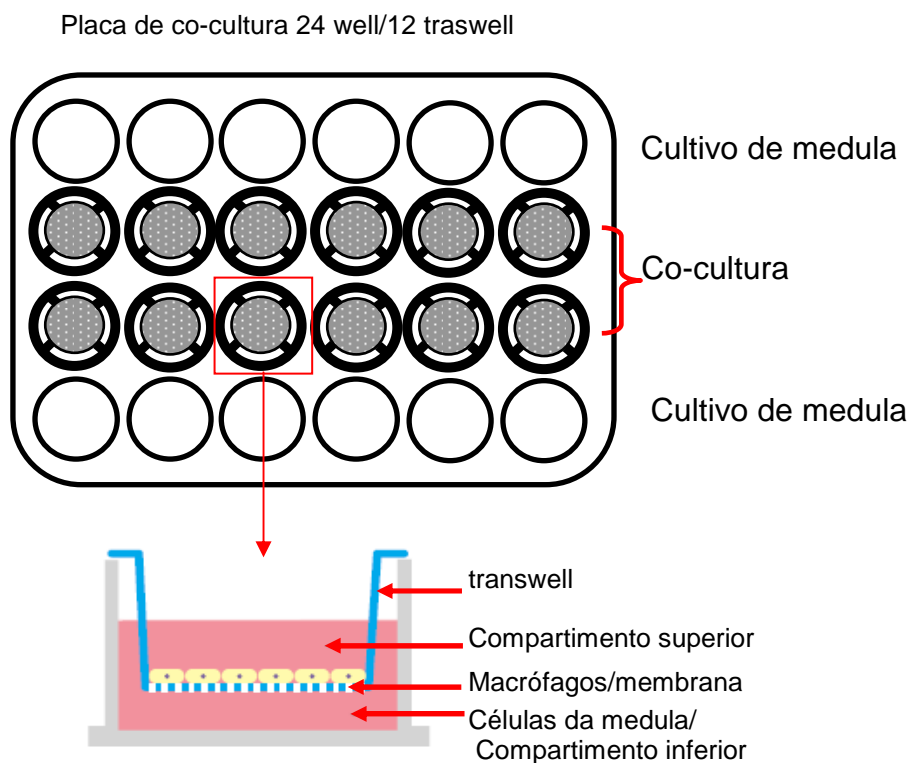


FIGURA 4 – ESQUEMA DA PLACA DE CO-CULTURA

5.5.3 Tratamento *in vitro* em co-cultura e células de medula óssea.

Para os tratamentos da co-cultura de células de medula óssea e macrófagos, foram utilizadas as mesmas soluções do tratamento dos camundongos (QUADRO 2).

Todas as soluções foram filtradas com membrana de 0,22µm Millipore® estéril, acondicionadas em garrafas novas e estéreis, codificadas e estocadas ao abrigo da luz. Após 2 horas de cultivo adicionou-se 20% de cada medicamento em relação à quantidade de meio. Na co-cultura de macrófagos com células de medula óssea, apenas os macrófagos receberam os tratamentos. Passadas 24, 48 e 72 horas foram adicionadas dose reforço de 1% em relação ao meio de cada solução. No cultivo de apenas células de medula óssea, o tratamento foi direto sobre essas células e seguiu o mesmo procedimento da co-cultura, durante as 96 horas. Todos os medicamentos e a HS foram sucussionados 15 vezes, antes de ser adicionados á

cultura (PIEMONTE, 2000). Um grupo sem tratamento, apenas com meio de cultura, foi utilizado como controle dos tratamentos.

5.6 Tratamento dos camundongos

Para o tratamento dos camundongos os medicamentos foram adicionados na água de beber dos camundongos. As soluções foram preparadas faltando uma diluição de 10 vezes, de forma a ser completada na hora do tratamento, sendo diluída 1/10 na água de beber. Vinte mL de cada solução foram estocadas em vidro pardo, limpo e novo. Inclusive contendo a solução hidroalcóolica (HS) e um com água destilada (controle). Foram preparados frascos para 7 dias de tratamento, ou seja, os camundongos receberam medicamentos novos todos os dias. Todos os frascos receberam códigos, de maneira que o avaliador não soubesse qual medicamento ou componente estava sendo avaliado, configurando assim, uma análise cega.

Código	Substância altamente diluída	Abreviatura	Potência do medicamento
Medicamento 3	Sol. hidroalcóolica	HS	
Medicamento 7	Água destilada	controle	
Medicamento 9	<i>Mercurius solubilis</i>	Merc sol	CH200
Medicamento 10	<i>Aconitum napellus</i>	Acon	CH30
Medicamento 11	<i>Atropa Belladonna</i>	Bell	CH200
Medicamento 12	<i>Arsenicum album</i>	Ars	CH6
Medicamento 13	<i>Lachesis muta</i>	Lach	CH200
Medicamento 14	<i>Thuya occidentalis</i>	Thuy	CH30
Medicamento 15	<i>Bryonia alba</i>	Bry	CH200

QUADRO 3 – SOLUCÕES ALTAMENTE DILUÍDAS USADAS PARA O TRATAMENTO DOS CAMUNDONGOS

Para esse estudo foram adquiridos mamadeiras, grades e gaiolas novas e utilizou-se sepilho autoclavado. Os camundongos foram pesados e divididos em grupos de 10 por caixa. Foram separados 7 grupos para os medicamentos, mais 2 grupos para os controles, um que recebeu água destilada e outro HS. Assim 9 grupos foram estabelecidos, cada um com o código equivalente ao das soluções. Os camundongos foram tratados durante 7 dias, todos os dias, por volta das 18 horas, levando-se em consideração o hábito noturno desses animais. No momento do tratamento as soluções de medicamento foram sucussionadas e misturadas a 180

ml de água mineral dentro das mamadeiras (As mamadeiras novas foram lavadas com água destilada para retirar qualquer resíduo). Ex: 20 mL do medicamento 9 (faltando uma diluição 1/10)+180 mL de água mineral = medicamento 9 (solução fornecida aos camundongos) (FIGURA 6). As soluções foram sucussionadas novamente e imediatamente antes de serem colocadas nas gaiolas.

No dia posterior, todas as mamadeiras eram retiradas e medida a solução restante. Após 7 dias os macrófagos e as células de medula óssea foram coletadas conforme descrito anteriormente.



FIGURA 5 – FIGURAS ILUSTRANDO COMO FOI REALIZADO O TRATAMENTO DOS CAMUNDOGOS COM O MEDICAMENTO 9

5.7 Estudos realizados com macrófagos.

Para avaliar o efeito dos medicamentos nas funções microbiais e tumorícidas dos macrófagos peritoneais, foram realizados ensaios para detecção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, *ex vivo* (após 7 dias de tratamento dos camundongos), após tratamentos *in vitro* e *in vitro* com posterior interação com leveduras. Para avaliar alterações ocorridas durante o processo de co-cultura com células de medula, como ativação morfológica dos macrófagos, foi utilizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

5.7.1 Interação de macrófagos com leveduras.

Para analisar a produção de espécies reativas após a fagocitose, foi realizada uma interação de macrófagos cultivados por 48 horas (H_2O_2 e O_2^-) e 72 horas (NO) com leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (ANEXO 4). Após o tempo de cultivo, o meio de cultura foi retirado e as células lavadas com meio sem soro. Foram

adicionadas 5×10^6 leveduras por poço, ou seja, 10 leveduras/macrófagos, diluídas em meio sem soro. A placa voltou para a incubadora por 40 min. O sobrenadante foi retirado e as células processadas para cada tipo de análise.

5.7.2 Avaliação da detecção de óxido nítrico (NO).

Como o NO é altamente reativo, difunde-se através da membrana e apresenta uma curta meia-vida de somente alguns segundos (VAN DER VEEN *et al.*, 2000), a avaliação da produção de óxido nítrico foi determinada indiretamente a partir da determinação da concentração de nitrito (NO_2^-), o qual é um produto estável da reação de produção de NO, no sobrenadante das culturas (ANEXO 5). O controle positivo foi incubado, após 48 horas de cultivo, com 50ng/mL de LPS+26U/mL de IFN- γ em meio DMEM por 24 horas em estufa a 37°C e em atmosfera com 5% de CO_2 . Após, então, 72 horas, 100 μ L do sobrenadante das células de todos os grupos foi transferido para outra placa de 96 poços. A esse sobrenadante foi adicionado 100 μ L do reagente de Griess (ANEXO 5) (GREEN *et al.*, 1982) que na presença de nitrito, reage para produzir uma cor lilás. A absorbância de cada amostra foi então determinada em leitor de microplacas Bio-RAD modelo Benchmarck com filtro de 550nm. A concentração de nitrito no sobrenadante das amostras foi calculada com base nos valores de D.O. obtidas para cada concentração (10 μ M-80 μ M) de uma curva padrão, confeccionada com a utilização de uma solução de nitrito de sódio diluído em meio de cultura, em concentração conhecida.

5.7.3 Avaliação da Detecção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A produção de H_2O_2 foi quantificada pelo método baseado na oxidação do vermelho de fenol pela H_2O_2 , dependente de peroxidase, segundo o método de PICK; MIZEL, 1981(ANEXO 6). Após os tempos de adesão, cultivo e interação com leveduras, as células foram lavadas duas vezes com Hank's Buffer Salt Solution (HBSS) (37°C). Foi adicionado 100 μ L de meio de incubação contendo vermelho de fenol a 1M e 15 U/ml de peroxidase dissolvidos em HBSS em todos os poços. O "phorbol myristate acetate" (PMA), na concentração de 1 μ L/ml, foi utilizado como controle positivo, uma vez que é conhecido como potencializador da produção de H_2O_2 pelos macrófagos. Cada grupo foi então analisado com e sem a presença de PMA. As placas de cultivo foram levadas a estufa a 37°C. Para que fosse possível

medir a variação da produção de H_2O_2 proporcional ao tempo de incubação, após os tempos de 15 e 30 min., 100 μl do sobrenadante das células foi retirado e transferido para um placa idêntica contendo 10 μl de solução aquosa de NaOH 1N em cada poço correspondente. A oxidação do vermelho de fenol foi quantificada através de leitura da absorbância em leitor de microplacas Bio-RAD® modelo Benchmarck utilizando filtro de comprimento de onda de 620 nm. Os resultados foram obtidos em densidade óptica e estão apresentados em nmoles de H_2O_2 /10⁶ células. Para a obtenção de um padrão, foi feita uma curva de concentração de H_2O_2 utilizando peroxidase (HRPO tipo VI-A, 1310U/ml – Sigma) com a concentração final de 15U/ml. Foram feitas três soluções de H_2O_2 nas diluições 1:10, 1:100 e 1:1000. A concentração dessas soluções foi determinada através de sua absorbância em 240 nm, sendo o resultado utilizado em um coeficiente de 39,58 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Diluições apropriadas da solução estoque foram usadas para a determinação do H_2O_2 produzido pelos macrófagos em cultura, segundo o método de PICK E KEISARI, 1980. A absorbância dessas diluições foi lida em leitor de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 620 nm e o resultado foi utilizado para confeccionar a curva padrão.

5.7.4 Avaliação da detecção de ânion superóxido (O_2^-)

Para a detecção do O_2^- liberado no sobrenadante celular, foi usado o método de redução do citocromo c (ANEXO 7) (JOHNSTON *et al*, 1978). Foi realizada uma curva de tempo entre 5 e 30 minutos no experimento *in vitro*. Uma produção crescente desse anion foi observada até cerca de 15 minutos. A partir desse ponto a concentração começou a diminuir. Para o tratamento dos camundongos foram testados apenas os tempos de 15 e 30 minutos.

O sobrenadante (o meio da cultura, no *in vitro* e *in vitro* após interação com leveduras e o lavado com células não aderidas no *ex vivo*) foi retirado e foram feitas duas lavagens com HBSS (37°C). As células foram encubadas com HBSS com citocromo c, na ausência ou presença de 1mg/ml phorbol miristate acetate (PMA). PMA foi usado como controle positivo devido a sua capacidade de induzir a produção de O_2^- . Após os tempos de 15 min e 30 min, o sobrenadante celular foi transferido para outra placa e sua Absorbância mensurada á 550 nm em um leitor de microplacas (BIO-RAD®). Para determinar a concentração de O_2^- correspondente à

concentração de citocromo c reduzido, usou-se o Coeficiente de Extinção Molar ($\epsilon = 2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). $C = A/\epsilon$ (A =absorbância) apresentados em nmoles de $\text{O}_2^-/10^6$ células.

5.7.5 Análise morfológica dos macrófagos através com MEV

Após as 96 horas de co-cultura em membrana de polycarbonato, observou-se as possíveis alterações morfológicas nos macrófagos, como ativação, devido ao tratamento e/ou interação com a membrana, ou não adaptação destes ao ambiente de cultivo. Para isto, foi removida a membrana de polycarbonato dos transwell e processada para microscopia eletrônica de varredura segundo o protocolo de rotina do laboratório (ANEXO 8). As células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,1M, por 1 hora, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratadas em bateria crescente de álcool e em aparelho de ponto crítico de CO_2 , e metalizadas para posterior observação em microscópio eletrônico de varredura JEOL do Centro de Microscopia da UFPR.

5.8 Estudos realizados com células de medula óssea.

5.8.1 Imunofenotipagem das células da medula óssea após tratamento dos camundongos

Após o tratamento dos camundongos e a obtenção das células, como descrito nos itens 5.8 e 5.5, as células foram imunomarcadas como descrito no protocolo em ANEXO 9. Foram utilizados cinco anticorpos biotinilados do sistema *Mouse Lineage Panel* e o anti-CD11c, todos da BD/Pharmingen® (QUADRO 3) e secundário conjugado com streptavidina-ficoeritrina. O sistema *Mouse Lineage Panel* foi desenvolvido para marcar as principais células da linhagem hematopoiética.

A leitura foi realizada em Citômetro de Fluxo FACSCalibur equipado com o laser de íon argônio (488nm) e detectores de dispersão para tamanho (FSC – *forward scatter*) e complexidade interna (SSC – *side scatter*), detectores de emissão de fluorescência FL1 (515-545 nm), FL2 (564-606nm) e FL3 (\square 670 nm), sendo que a ficoeritrina foi detectada pelo canal FL2. Os dados foram analisados pelo *software Cell Quest*.

Anticorpo	Marcador (descrição)
anti-CD3e	linfócitos T (específico para a cadeia epsilon do complexo CD3)
anti-CD45R (B220)	linfócitos B
anti-CD11b	monócitos/macrófagos (específico para a cadeia α [M] do complexo CD11b/CD18)
anti-Ly-6G (Gr-1)	série granulocítica
anti-TER-119 (Ly-76)	série eritrocítica
anti-CD11c	células dendríticas (específico para a cadeia α X do complexo CD11c/CD18)

QUADRO 4 – ANTICORPOS UTILIZADOS PARA IMUNOFENOTIPAGEM

FONTE: TECHNICAL DATA SHEET BIOTIN MOUSE LINEAGE PANEL (http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/mouse/live/web_enabled/0144KK_559971.pdf) e APC HAMSTER ANTI-MOUSE CD11 (http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/mouse/live/web_enabled/09709A_550261.pdf).

5.8.2 *In vitro* e co-cultura

5.8.2.1 Detecção de CD11b em células da medula óssea em citometria de fluxo

Para a análise em citometria de fluxo, tanto as células do sobrenadante da cultura de medula óssea, quanto as aderentes, seguiram o protocolo em ANEXO 9. Após as 96 horas de cultivo, as células não aderentes foram transferidas para microtubos de centrífugas e processadas. As células aderentes foram soltas com jatos de PBS a 4°C, em seringa de 1 mL e agulhas. Transferidas para microtubos de centrífuga e processadas. Todas as células foram fixadas com paraformaldeído 1%, incubadas com 0,5µg% do anticorpo biotinilado anti-CD11b por 40 min., e com secundário streptavidina-ficoeritrina por 30 min. Seguiu-se, então para a leitura em citometria de fluxo como descrito no item imunofenotipagem.

5.8.2.2 Detecção e quantificação de CD11b em células aderentes da medula óssea através de microscopia confocal.

Antes do plaqueamento das células para a microscopia confocal, foram colocadas lamínulas de cultivo dentro dos poços das placas de cultura. Após as 96 horas de cultivo, seguiu-se o protocolo em ANEXO 10. As células aderentes foram

incubadas com 0,5µg% com anticorpo biotilado anti-CD11b por 40 min., fixadas com paraformaldeído 2% por 40 min, incubadas com anticorpo anti-porção Fc, por 40 min, na concentração final de 1µg% (para se evitar marcações inespecíficas), e posteriormente com secundário streptavidina-ficoeritrina por 40 min. As lamínulas foram montadas com o meio de montagem para fluorescência (corante nuclear), da marca Vectashield®. Após o experimento, as células foram analisadas com auxílio do Microscópio Confocal Radiance 2001 (Bio-Rad[□]) acoplado à Eclipse E800 (Nikon[□]). A ficoeritrina foi excitada pelo laser de íon argônio a 488nm e o DAPI pelo laser *blue diode* a 350nm.

5.9 Estatística

A análise estatística foi realizada a partir da análise de variância (ANOVA: fator único) dos valores obtidos. O ANOVA foi realizado para garantir se havia ou não homogeneidade entre os dados. Foi utilizado também o teste de Tukey. Esse teste é realizado visando encontrar a diferença mínima entre as médias para que exista diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Para isso, foi aplicada a seguinte fórmula:

$$To = q\sqrt{QME / R}$$

Onde q é o valor encontrado na tabela de valores da amplitude total (q) para $\alpha = 5\%$, segundo o número de tratamento (k) e os graus de liberdade do resíduo (grau de liberdade do erro); QME é o MQ do erro, e R é o número de repetições (VIEIRA, 1980). Para realizar estes testes foram utilizados os programas Excel e confirmados com o GraphPad Prism 5.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram analisados 12 medicamentos produzidos a partir de 7 substâncias altamente diluídas segundo os princípios da homeopatia, usados tradicionalmente e mundialmente. Como ferramentas de estudo das suas ações no sistema imunológico, foram primeiramente utilizados macrófagos peritoneais e posteriormente, células da medula óssea de camundongo. Os resultados apresentados de forma esquemática no quadro abaixo serão discutidos de forma geral e posteriormente, individual (separado por medicamento), pois apesar de muitos resultados serem semelhantes entre eles, cada um dos medicamentos atua diferentemente sobre as células

Medicamento		Merc sol			Acon	Bell			Ars	Lach			Thuy	Bry
CH		6	12	200	30	6	30	200	6	12	200	30	200	
Macrófagos	NO <i>in vitro</i>	↑	↑	↑	↑	↑	-	↑	↑	↑	↑	↑		X
	NO levedura	-	-	-	↓	-	-	-	↓	-	↓	-		X
	NO <i>ex vivo</i>	X	X	-	-	X	X	-	-	X	↑	-		-
	H ₂ O ₂ <i>in vitro</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		X
	H ₂ O ₂ leved.	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-	-	↓	-		X
	H ₂ O ₂ <i>ex vivo</i>	X	X	↑	↑	X	X	-	↓	X	↓	-		↑
	O ₂ ⁻ <i>in vitro</i>	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓	↓	-	↓	↓		X
	O ₂ ⁻ levedura	-	-	-	↓	-	↓	-	-	-	-	↓		X
	O ₂ ⁻ <i>ex vivo</i>	X	X	↓	↓	X	X	↑	↓	X	↓	↓		↓
	MEV	X	X	↑	↑	X	X	↑	↑	X	↑	↑		↑
Células de medula óssea	CD3 ⁺ <i>ex vivo</i>	X	X	↓	-	X	X	-	↑	X	↑	↑		-
	CD45R ⁺ <i>ex vivo</i>	X	X	-	↑	X	X	↑	-	X	↑	↑		-
	CD11b ⁺ <i>ex vivo</i>	X	X	-	-	X	X	-	-	X	↓	-		↑
	Ly-6G ⁺ <i>ex vivo</i>	X	X	-	-	X	X	↓	-	X	-	-		↑
	TER-119 ⁺ <i>ex vivo</i>	X	X	-	-	X	X	-	-	X	-	-		-
	CD11c ⁺ <i>ex vivo</i>	X	X	-	-	X	X	-	↑	X	↑	↑		↑
	CD11b ⁺ <i>in vitro</i> sobrenadante	X	X	↑	↑	X	X	-	-	X	-	-		-
	CD11b ⁺ <i>in vitro</i> cocult. Não aderente	X	X	-	-	X	X	-	-	X	↓	↓		↓
	CD11b ⁺ <i>in vitro</i> cocult. aderente confocal	X	X	-	-	X	X	-	↑	X	-	↑		↑

(↑) = Aumentou em relação ao controle; (↓) = diminuiu em relação ao controle; (-) - sem diferença significativa; X - não foi estudado

QUADRO 5 – RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS

6.1 Resultados e discussão geral

Métodos bem estabelecidos na imunologia moderna e biologia celular têm sido adotados para testar efeitos de drogas homeopáticas comercialmente disponíveis ou de princípios ativos diluídos de acordo com os métodos homeopáticos tradicionais. Estudos laboratoriais com células e especialmente leucócitos representam um campo fértil no qual pesquisadores homeopáticos e convencionais têm trabalhado juntos (BELLAVITE *et al.*, 2006). Neste trabalho, todos os medicamentos

homeopáticos estudados mostraram atuar de alguma maneira tanto sobre macrófagos quanto em seus precursores, assim como nas demais células precursoras do sistema imunológico. Terapias focadas no estímulo e recrutamento de macrófagos tem sido foco de pesquisas relacionadas à resolução de diversas patologias como câncer e doenças inflamatórias. Dependendo dos receptores de reconhecimento utilizados, a sua fase e do estado de diferenciação, podem liberar diversos produtos de secreção, incluindo citocinas, que mobilizam outras células do hospedeiro e influenciam células residentes em outros tecidos. (GORDON, 1998).

Liberação de ROS e RNS por macrófagos.

Macrófagos estão claramente envolvidos na inflamação através da secreção de moléculas e participam de todas as respostas imunológicas (GORDON, 2003). A análise da liberação das espécies reativas mostrou que todos os medicamentos, de alguma maneira, alteram a liberação dos radicais. A ação dos medicamentos homeopáticos na liberação de espécies reativas pode ter várias consequências, muitas delas relacionadas ao seu grande potencial destrutivo, porém ROS e RNS também podem atuar como segundo mensageiros, modulando vias de ativação celular (BROWN; GRIENDLING, 2009). Um alto estresse oxidativo está associado a ameaças para funções das células e sua vitalidade. Por outro lado, pequenas perturbações no estado estacionário de ROS está envolvido com liberação de fatores de crescimento e a expressão de receptores que medeiam a sinalização celular (FORMAN; TORRES, 2001). De maneira geral, após o tratamento *in vitro* pode-se verificar que praticamente todos os grupos tratados (com exceção da Bell CH30) aumentaram significativamente a liberação de NO. E diminuíram (com exceção de Acon CH30 e Lach CH12) a liberação de O_2^- . No entanto, a liberação de H_2O_2 não foi alterada com nenhum dos medicamentos. Após a interação com leveduras, a detecção no sobrenadante de H_2O_2 (tempos de 15 e 30 min. de incubação) foi menor nos grupos com leveduras do que naqueles sem leveduras; já a liberação de NO e O_2^- (apenas no tempo de 15 min. de incubação) foi maior. Essa generalização pode sugerir que os medicamentos homeopáticos aumentam a liberação de NO um radical menos reativo e que possui grande efeito estimulador e sinalizador das células imunológico, e diminui ou não altera a liberação dos demais radicais, desempenhando assim, um efeito protetor do estresse oxidativo. Durante o

estímulo de defesa celular, ocorre um aumento normal e fisiológico na produção de espécies reativas, e consequentemente um aumento na liberação dos radicais. Muitos dos medicamentos usam esse aumento na produção de radicais a favor da defesa da célula. Eles diminuem a liberação dos radicais, provavelmente por direcionar essa produção para a destruição dos microorganismos.

A análise da liberação dos radicais após o tratamento dos camundongos não mostrou resultados tão generalizados quanto os do tratamento *in vitro*, provavelmente devido a intervenções de outras células do organismo.

Morfologia dos macrófagos tratados com medicamentos homeopáticos

Todos os medicamentos homeopáticos ativaram morfologicamente os macrófagos peritoneais, corroborando os resultados encontrados por Oliveira (2005).

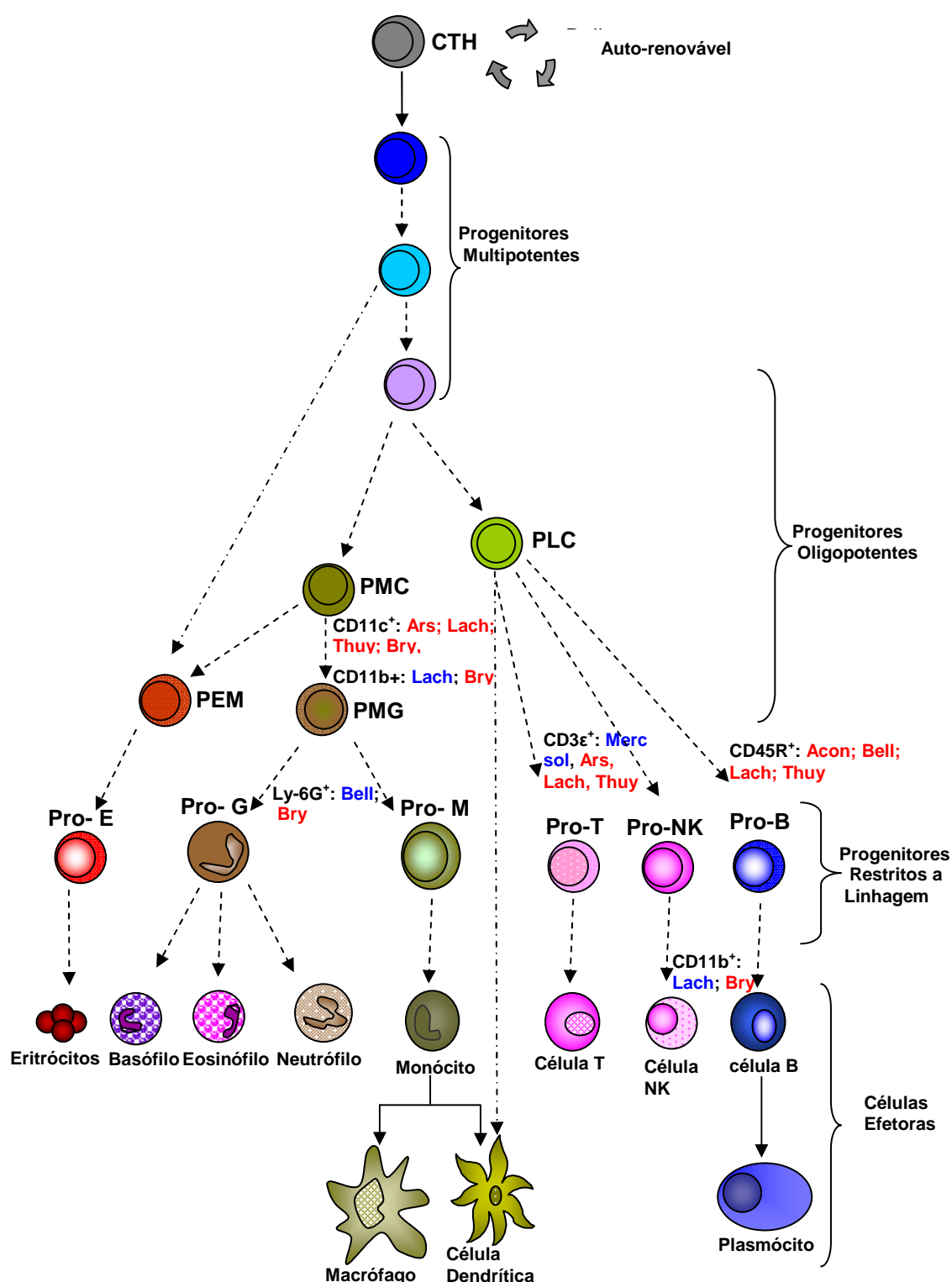
Condições dos camundongos após os tratamentos

Ao final do tratamento, cada animal bebeu cerca de 10 mL/dia de solução. No 8º dia, os animais foram pesados novamente. Com a avaliação da quantidade de água ingerida pelos animais e a análise do peso, verificou-se que todos estavam ingerindo as soluções, pois a média de líquido restante na mamadeira manteve-se constante diariamente, além de não ocorrer diferença no peso dos animais controles e tratados dentro dos oito dias.

Imunofenotipagem das células da medula óssea

As células hematopoiéticas dão origem a todas as células sanguíneas: linfócitos T, B, NK, granulócitos, monócitos, megacariócitos e eritrócitos. A expressão de diferentes receptores na superfície dos progenitores hematopoiéticos permite sua interação com vários elementos reguladores presentes no ambiente, nos quais se incluem as células estromais, as moléculas de matriz extracelular e citocinas regulatórias, como fatores de crescimento e diferenciação (GUNSILIUS *et al.*, 2001). Após o tratamento dos camundongos, todos os medicamentos homeopáticos alteraram algum dos marcadores das células precursoras hematopoiéticas. Somente não foi verificada alteração na expressão do receptor Ter-119, da linhagem eritrocítica, sugerindo que provavelmente esses medicamentos atuam apenas nas células efectoras do sistema imunológico (FIGURA 6).

Macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, linfócitos T CD4+, T CD8+ e B são células que controlam o sistema imunológico, e são descritas como potenciais efetoras contra neoplasias e são exaustivamente estudadas em vias de ativação de resposta imunitária visando a imunoterapia contra células neoplásicas, processos infecciosos, inflamatórios e na modulação da resposta imunológica. (UNANUE; ALLEN, 1987; MOLIFE; HANCOCK, 2002). Dessa forma, medicamentos homeopáticos agindo sobre essas células, estariam regulando o sistema imunológico.



CTH, células tronco hematopoiética ; PLC, progenitor comum linfóide; PMc, progenitor comum mielóide; PEM, progenitor comum eritróide/megacariócito; PMG, progenitor de monócito/granulócito; Pro-E, progenitor de eritróide; Pro-G, progenitor de granulócito; Pro-M, progenitor monócito; Pro-T, progenitor de célula T; Pro-NK, progenitor de célula NK; Pro-B, progenitor de célula B. Medicamentos em azul diminuíram a expressão do marcador e em vermelho aumentaram a expressão do marcador.

FIGURA 6 – ESQUEMA DE HEMATOPOIESE MOSTRANDO A PARTIR DE QUAL LOCAL PROVAVELMENTE OS MEDICAMENTOS COMEÇAM A AGIR.

Co-cultura e tratamento *in vitro* das células de medula óssea

Com os resultados da imunofenotipagem, surgiu a necessidade de entender se os medicamentos homeopáticos estariam atuando diretamente sobre as células precursoras do sistema imunológico e/ou via ativação dos macrófagos. Para responder essa questão, foram realizados experimentos *in vitro* de células de medula e co-cultura dessas com os macrófagos peritoneais. Esses experimentos possibilitaram analisar a ação dos medicamentos sobre células CD11b⁺, marcador da linhagem monocítica, usando o mesmo anticorpo da imunofenotipagem com leitura em microscopia confocal e citometria de fluxo.

Hematopoiese é um processo altamente regulado que ocorre no microambiente da medula óssea. Ele tem sido visualizado como o resultado de um balanço entre sinais que estimulam e sinais que inibem a proliferação e diferenciação de progenitores hematopoiéticos. Progenitores hematopoiéticos crescem em uma estreita associação com células estromais e diversos receptores de adesão, que estão presentes nos progenitores, permitem interação com as células estromais e a matriz estromal extracelular. A adesão, por si só, pode alterar a proliferação e diferenciação das células progenitoras hematopoiéticas (HURLEY *et al.*, 1995). Após o tratamento da medula óssea *in vitro*, os medicamentos Merc sol CH200 e Acon CH30 mostraram um aumento significativo de marcador CD11b no sobrenadante da medula e os demais (com exceção do Ars CH6) mostraram uma tendência no aumento desse marcador. Esse aumento no marcador da linhagem mielóide, sugerem que os medicamentos homeopáticos estariam atuando na proliferação dessas células precursoras, ao contrário do que se observa na co-cultura. Nesta técnica, todos os medicamentos diminuíram a expressão do marcador CD11b nas células do sobrenadante da cultura da medula (significativos para Lach CH200, Thuy CH30, Bry CH200) e aumentaram CD11b⁺ nas células aderentes da medula óssea (significativo para Ars CH6, Thuy CH30 e Bry CH200). De um modo geral, as células progenitoras têm uma maior proliferação se não estiverem em contato com as células do estroma e matriz extracelular, e uma maior diferenciação dessas células ocorre a partir da interação de seus receptores com estroma e matriz (HURLEY, *et al.*, 1995). Assim, os macrófagos da co-cultura, juntamente com os medicamentos homeopáticos estariam estimulando a adesão dos precursores da linhagem mielóide e sua conseqüente proliferação e diferenciação, pois a quantidade de células no

sobrenadante da cultura é próximo daquela da medula, no entanto, a quantidade de células aderidas é maior (dados observados, mas não quantificados) Outra explicação para o aumento de células marcadas CD11b+ no sobrenadante da medula óssea tratada *in vitro*, é que a maioria dos medicamentos estaria favorecendo diferenciação das células mielóides, as quais se desprenderiam do estroma ao se diferenciarem, como granulócitos (os primeiros a se soltarem e estão em maior quantidade) e células dendríticas. Estas células, uma vez maduras na cultura da medula óssea, se soltam e ficam no sobrenadante, diferente de macrófagos que, mesmo diferenciados, permanecem aderidos (CITTERIO, *et al.*, 1999; INABA, *et al.*, 1992). Interessantemente, somente os medicamentos que estimularam a liberação de IL-4 por macrófagos tratados *in vitro* em Oliveira (2005), induziram o aumento de CD11b+ no sobrenadante da medula. Essa citocina é responsável pela expansão e recrutamento de células mielóides no início de sua diferenciação (SNOECK, *et al.*, 1996), além de favorecer a diferenciação de células dendríticas (BONTKES, *et al.*, 2002). Aumento significativo na marcação de CD11b ocorre quando se compara o sobrenadante do controle das células da medula da co-cultura com o sobrenadante do controle do cultivo apenas da medula. Assim, pode-se sugerir que a presença de macrófagos estimula uma proliferação das células da medula óssea.

Novas estratégias terapêuticas podem emergir destes novos conhecimentos, indo desde a terapia celular a tratamentos do organismo com um todo. Uma vez que muitos medicamentos mostraram possuir efeitos diferentes de acordo com o sistema adotado.

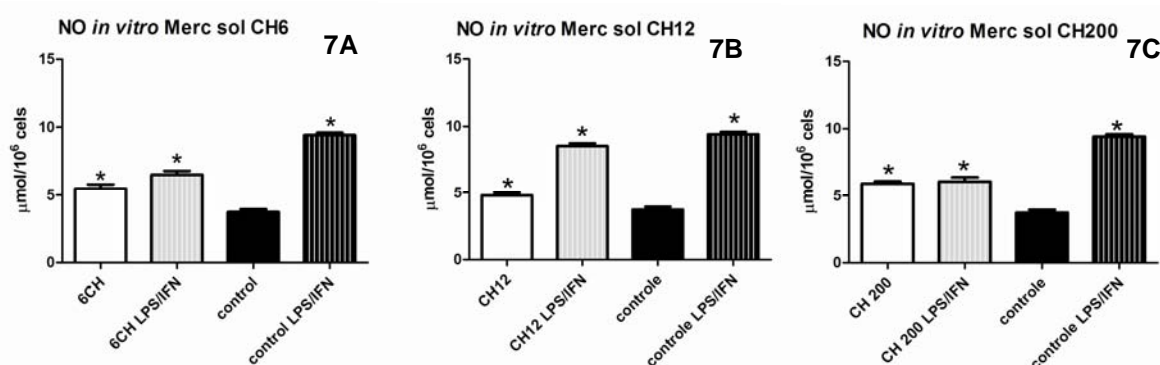
6.2 Resultados e discussão individual

6.2.1 *Mercurius solubilis*

Neste trabalho, foram testadas diferentes diluições do composto mercurial *Mercurius solubilis* de fórmula $\text{Hg}_4\text{ON} \cdot \text{H}_2\text{NO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$, *in vitro* (CH6, CH12 e CH200) e *in vivo* (CH200) em macrófagos e células de medula óssea de camundongo. OLIVEIRA, 2005 mostrou que Merc sol possui atividade biológica, alterando funções de macrófagos peritoneais no sistema imunológico. Após tratamento *in vitro*, todas as potências de Merc sol ativaram morfologicamente macrófagos. A ativação faz com que essas células passem de um estado residente para ativado e consequentemente aumentem ou iniciem suas funções efetoras, como a produção de ROS e NO. Dessa forma a avaliação da produção e/ou liberação dessas espécies podem ser úteis para analisar a atividade destas células.

Análises após tratamento *in vitro*

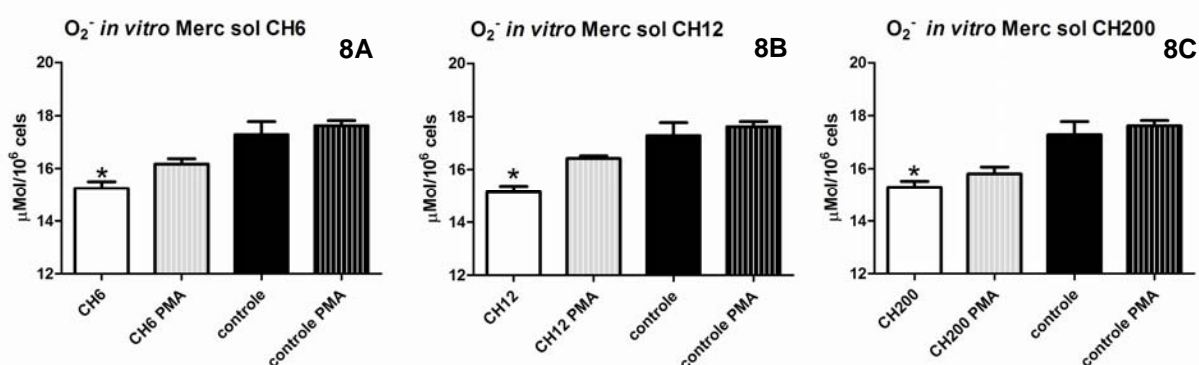
O NO faz parte de mecanismos de defesa imunológico não específico e é gerado durante processos imunológicos e inflamatórios (COLEMAN, 2001). Após tratamento *in vitro* dos macrófagos com Merc sol, todas as potências mostraram estimular a liberação de NO no sobrenadante da cultura, aumentando significativamente (FIGURA 7). Sugerindo que esses medicamentos estariam atuando nas funções de defesa dos macrófagos.



Figuras 7A, 7B e 7C – (*) indicam grupos com aumento significativo ($P < 0.05$) comparado ao controle de NO após tratamento *in vitro* de macrófagos com CH6, 12 e 200, respectivamente, e cultivo por 72 horas. Todos os resultados são expressos como média ± erro padrão.

FIGURA 7 – LIBERAÇÃO DE NO POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO *IN VITRO* COM MERC SOL

O NO por si só, é uma molécula com pouca reatividade química com moléculas orgânicas e preferencialmente liga-se a metais, mas em células que produzem ambos NO e O_2^- , ele pode atravessar a membrana em direção a fonte de O_2^- e juntos formarem $ONOO^-$ (FORMAN; TORRES, 2001) dentro das vesículas nos dos macrófagos. De fato, em nossos experimentos, o tratamento *in vitro* com todas as potências de Merc sol diminuiu a liberação de O_2^- (FIGURA 8).



Figuras 8A, 8B e 8C – (*) indica grupos com diminuição significativa ($P < 0.05$) comparado ao controle de O_2^- após tratamento *in vitro* de macrófagos com CH6, 12 e 200, respectivamente, e cultivo por 48 horas. Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 8 – LIBERAÇÃO DE O_2^- POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO *IN VITRO* COM MERC SOL

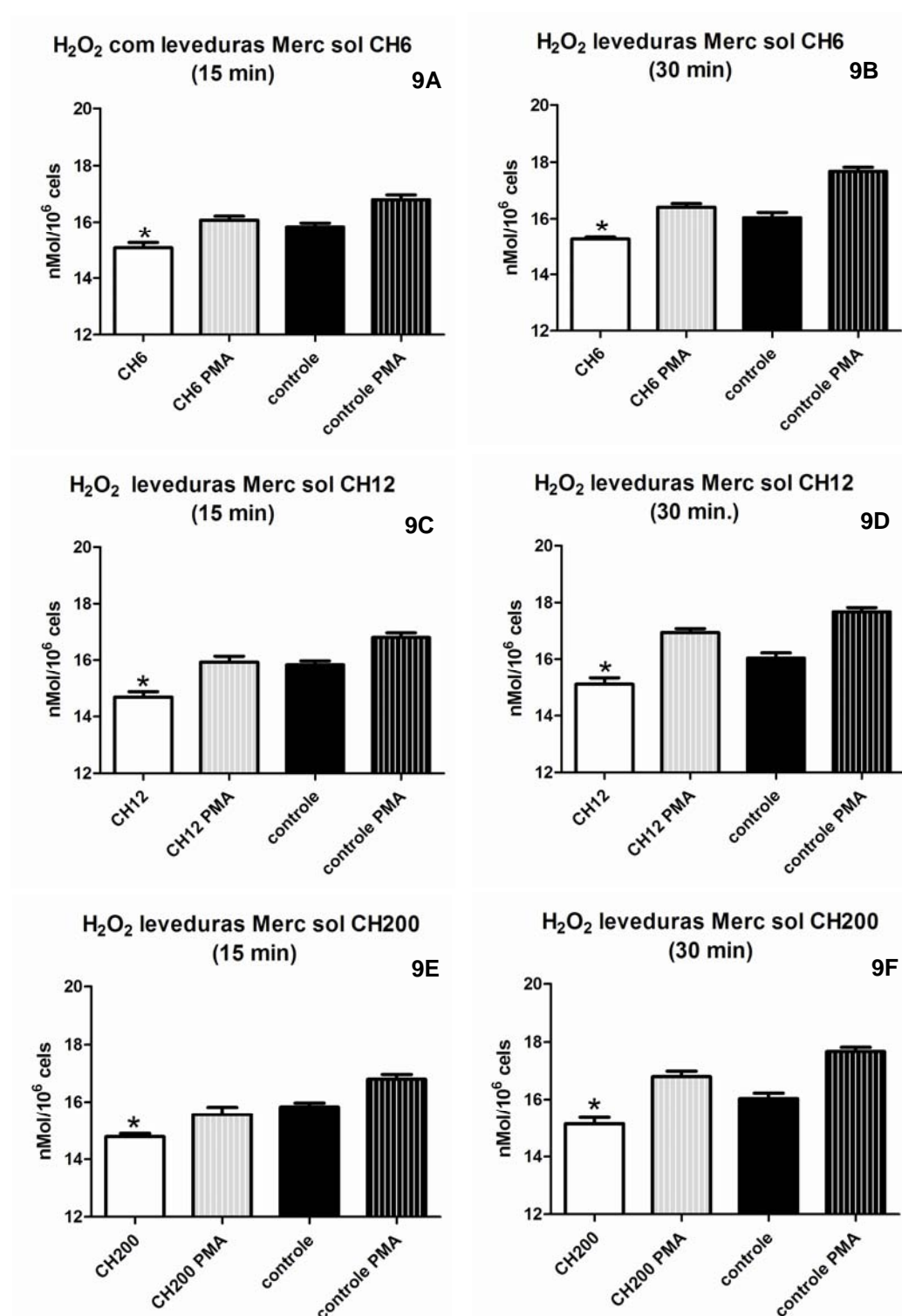
Fagócitos podem gerar $ONOO^-$ para destruir patógenos, ou atuar como uma defesa antioxidante por prevenir um aumento na concentração de O_2^- e H_2O_2 (NATHAN; SHILOH, 2000). Dessa forma, as potências de Merc sol podem estar induzindo a formação de $ONOO^-$ dentro das vesículas fagocíticas, e consequentemente diminuindo a concentração de O_2^- no sobrenadante da cultura, o que contribui para uma diminuição do estresse celular. No caso do tratamento com potência CH200 de Merc sol, outra hipótese que pode explicar a diminuição na liberação de O_2^- é a inibição da enzima produtora de O_2^- (NOX2) por IL-4, como foi descrito em Zhou, *et al.* (1995). Em 2005, Oliveira mostrou que macrófagos tratados com Merc sol CH200 aumentavam a liberação dessa citocina. Assim consequentemente, o medicamento atuaria regulando o processo inflamatório dos macrófagos e reduzindo danos causados por excesso de produção de O_2^- .

O NO liberado por macrófagos tratados com Merc sol deve também ativar o fator nuclear de transcrição NF- κ B, cuja ativação é essencial para a expressão de

um grande número de citocinas e genes de adesão que são mediadores críticos para reação inflamatória (BRUCKDORF, 2005; FORMAN; TORRES, 2001). Esta hipótese pode ser sustentada para as potências CH6 e CH12 com o trabalho de OLIVEIRA, 2005 o qual mostrou que macrófagos tratados *in vitro* com essas potências, aumentam a liberação de $\text{IFN}\gamma$, citocina que também estimula NF- κ B (BRUCKDORF, 2005). Assim, o tratamento *in vitro* com potências CH6, 12 e 200 pode estar atuando no aumento das funções efetoras dos macrófagos e/ou na sinalização de resposta inflamatória via NO e ainda na redução do estresse oxidativo. Interessantemente, o tratamento com Merc sol nos grupos positivos (LPS e $\text{IFN}\gamma$) reduziu a liberação de NO. Em 2002, Kim, *et al.*, demonstraram que o NO produzido por indução do LPS é inibido de uma maneira dose-dependente por HgCl_2 (5–20 μM) em macrófagos J774A.1.

NOX2, a enzima responsável pela produção da maior parte de O_2^- , em fagócitos, é estimulada também após fagocitose (CROSS; SEGAL, 2004). Esse estímulo faz com que NOX2 produza O_2^- para dentro do fagossomo (BROWN; GRIENDLING, 2009). De fato, quando se compara os experimentos com e sem leveduras, todos os grupos do experimento com leveduras mostraram liberar uma menor quantidade de H_2O_2 . E nos grupos tratados com as potências CH6, 12 e 200 esse decréscimo de H_2O_2 foi ainda menor do que o controle com levedura (após os tempos de incubação de 15 e 30 min.) (FIGURA 9).

O O_2^- na ausência de NO, é rapidamente dismutado a H_2O_2 (FORMAN; TORRES, 2001). H_2O_2 , juntamente com íons cloreto pode ser convertido em ácido hipocloroso (HOCl), pela mieloperoxidase. HOCl é um oxidante antimicrobica altamente eficaz (BROWN, GRIENDLING, 2009). Como nenhuma das potências de Merc sol alterou a liberação de NO após a interação macrófagos/leveduras, pode-se sugerir que o H_2O_2 produzido nos macrófagos tratados pode estar sendo convertido ao agente bactericida HOCl no fagossomo, aumentando a destruição do microorganismo e conseqüentemente diminuindo a liberação extracelular desse reativo no sobrenadante da cultura. A liberação de O_2^- por macrófagos após a interação com leveduras não mostrou alteração após os tratamentos com Merc sol. Provavelmente o H_2O_2 convertido em HOCl foi aquele que seria liberado pela célula, sem ser necessário uma produção maior desse radical. Evita-se dessa forma, um estresse oxidativo, mesmo num evento de defesa do organismo.



(*) indica grupos com diminuição significativa de H₂O₂ ($P < 0.05$) comparado ao controle após tratamento *in vitro* de macrófagos com CH6 (9A e 9B), 12 (9C e 9D) e 200 (9E e 9F), cultivo por 48 horas e posterior interação com leveduras.. Resultados significativos após 15 e 30 min. de incubação. Todos os resultados são expressos como média ± erro padrão.

FIGURA 9 – LIBERAÇÃO DE H₂O₂ POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO *IN VITRO* COM MERC SOL

Análises após tratamento dos camundongos

Para os tratamentos dos camundongos, foi utilizado apenas Merc sol na potência CH200. Após o tratamento dos camundongos com Merc sol CH200 ocorreu uma diminuição na liberação de O_2^- (FIGURA 10) após o tempo de 30 min. e um aumento de H_2O_2 (FIGURA 11) após o tempo de 15 min.

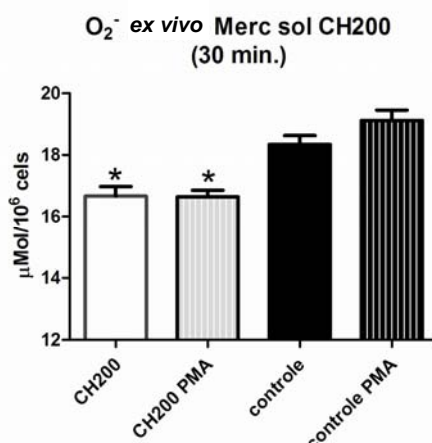


Gráfico mostrando a diminuição significativa na liberação de O_2^- (30 min. de incubação), quando comparado ao controle (*) ($P < 0.05$) após tratamento *in vivo*. Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 10 – LIBERAÇÃO DE O_2^- POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO *IN VIVO* DOS CAMUNDONGOS COM MERC SOL.

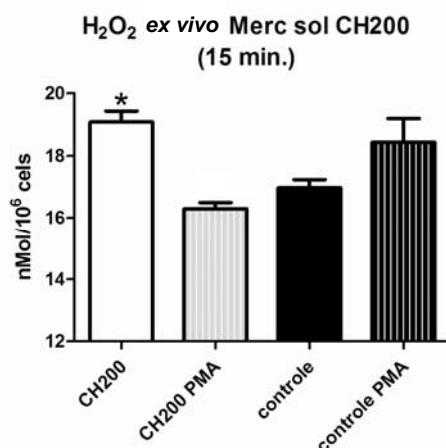
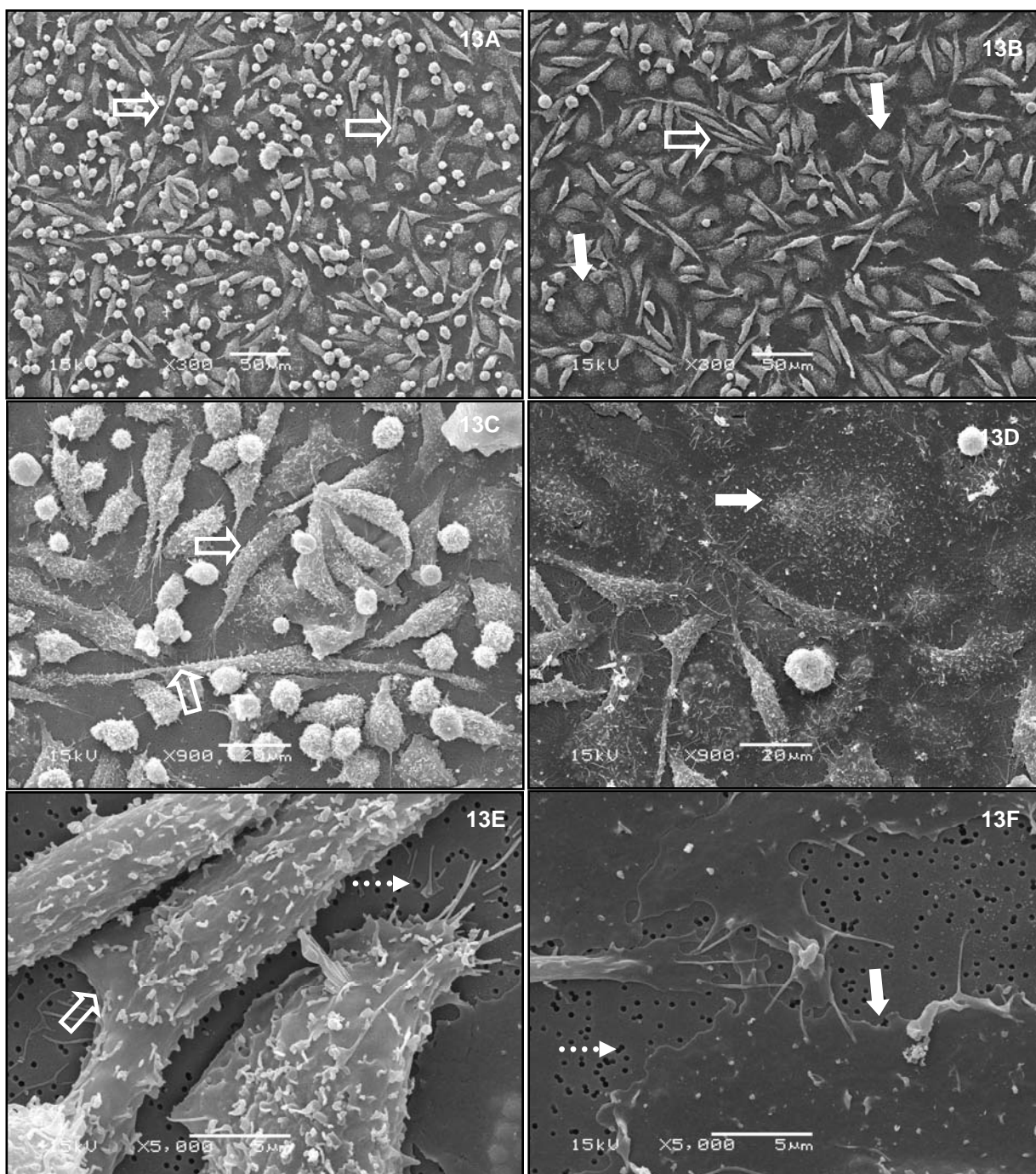


Gráfico mostrando aumento significativo na liberação de H_2O_2 (15 min. de incubação), quando comparado ao controle (*) ($P < 0.05$) após tratamento *in vivo*. Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 11 – LIBERAÇÃO DE H_2O_2 POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO DOS CAMUNDONGOS COM MERC SOL

De fato, O_2^- pode ser dismutado a H_2O_2 ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$), o qual pode rapidamente se difundir através de membranas. Isto pode ocorrer em resposta a vários estímulos, incluindo citocinas, fatores de crescimento, e está envolvido na

morfologicamente macrófagos (OLIVEIRA, 2005), aumentando a quantidade de ativados no grupo tratado.



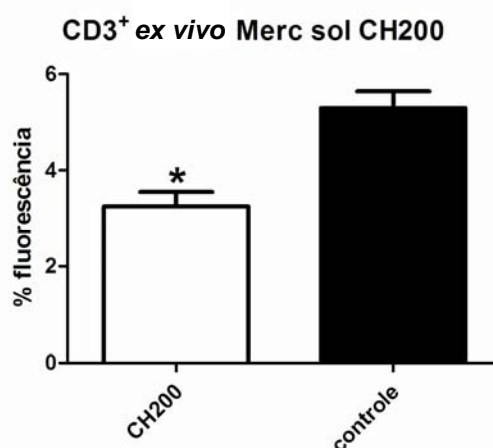
MEV de macrófagos co-cultivados com medula óssea por 96 horas. A, C e E - macrófagos controle, B, D e F - tratados com Merc sol CH200

Setas abertas = macrófagos residentes; setas fechadas = macrófagos ativados; setas tracejadas = poros da membrana

FIGURA 13 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM MERC SOL EM CO-CULTURA

Imunofenotipagem das células da medula óssea

Após o tratamento dos camundongos com Merc sol CH200, as células da medula óssea foram imunomarcadas. A imunofenotipagem do grupo de células correspondentes ao medicamento mostrou que as células marcadas positivamente para CD3 ϵ diminuíram com Merc sol CH200 (FIGURA 14). Os outros marcadores celulares não foram alterados significativamente.



(*) diminuiu significativamente em relação ao controle ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 14 – CD3 ϵ ⁺ EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO *IN VIVO* COM MERC SOL

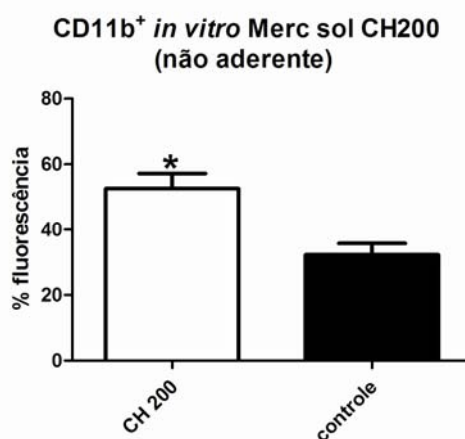
CD3 ϵ pode ser detectado desde precursores da linhagem de células T na medula óssea até ser altamente expresso em células T maduras (KLEIN, *et al.*, 2003). Faz parte do complexo CD3, o qual é um formado por 4 polipeptídeos (CD3 ϵ , γ , δ , ζ). Quando expressos juntamente os heterodímeros do pre-TCR (receptor de células T imaturas) e do TCR (receptor de células T maduras) formam os grandes complexos pT-CD3 ou T-CD3, respectivamente. Esses polipeptídeos são centrais no funcionamento desses dois receptores. CD3 ϵ tem um papel fundamental no desenvolvimento inicial de células T e é essencial para a expressão e função do pre-TCR e TCR (DEJARNETTE, *et al.*, 1998; DAVE, 2009). Linfócitos T são inicialmente gerados na medula óssea e, uma grande parte, termina sua diferenciação no timo (BANDHOOLA, *et al.*, 2003). A população de precursores de células T na medula é heterogênea, assim como as células que são recrutadas ao timo. O timo é apenas periodicamente receptivo às células precursoras, sugerindo um nível de

comunicação entre Timo e medula óssea que recruta os precursores (BANDHOOLA, *et al.*, 2003; BANDHOOLA; SCHWARZ, 2006; LAI; KONDO, 2008). Para que os precursores de células T da medula óssea sejam mobilizados para a corrente sanguínea em direção ao timo é necessário primeiramente que estes sejam liberados da adesão com as células estromais e liberados no sangue. Esse processo é chamado de mobilização (BANDHOOLA; SCHWARZ, 2006). Os resultados de imunofenotipagem demonstraram Merc sol medula óssea, diminui células CD3 ϵ ⁺. Então é possível que o tratamento estimule o processo de mobilização destas células, provavelmente em direção ao Timo. Algumas descrições na literatura têm mostrado o envolvimento das integrinas da família $\alpha\beta$ na mobilização de precursores de células T na medula óssea (BANDHOOLA; SCHWARZ, 2006). Neste estudo, Merc sol CH200 mostrou possuir ação *in vitro* sobre um desses componentes (FIGURA 15) nas células da medula, provavelmente induzindo sua desadesão. Como a molécula CD3 também está diretamente envolvida na sinalização que regula a adesão e a migração de células T (PRIBILA; SHIMIZU, *et al.*, 2003), podemos sugerir que esse medicamento esteja estimulando o recrutamento das células precursoras ao Timo, diminuindo assim a sua marcação na medula óssea.

CD11b⁺ em células de medula óssea

Após cultivo de 96 horas, as células não aderentes da medula óssea foram processadas e incubadas com anticorpo anti-CD11b. A leitura em citometria de fluxo mostrou que o tratamento *in vitro* das células de medula óssea com o medicamento Merc sol CH200 induziu um aumento na sua marcação CD11b⁺ (FIGURA 15).

CD11b esta evolutivamente relacionada ao receptor integrina que medeia adesão celular à matriz extracelular durante o desenvolvimento e reparo tecidual (GEORGAKOPOULOS, *et al.*, 2008). Nas CTHs, CD11b é um dos primeiros marcadores detectados durante a diferenciação de monócitos e granulócitos nos estágios mielocíticos e monoblásticos (ARNAOUT, 1990; KISHIMOTO, *et al.*, 1990, YANG, *et al.*, 2007). As CTHs para se diferenciarem precisam estar aderidas ao estroma, ao contrário da sua proliferação (INABA, *et al.*, 1992).



(*) aumentou significativamente em relação ao controle ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

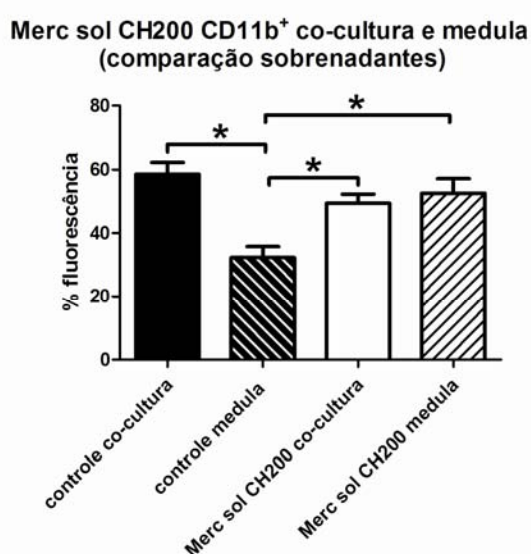
FIGURA 15 – CD11b⁺ EM CÉLULAS NÃO ADERENTES DE MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO *IN VITRO* COM MERC SOL

Uma vez que o tratamento com Merc sol aumentou a porcentagem de células CD11b⁺ não aderentes, é provável que o medicamento esteja estimulando a proliferação dessas células. Oliveira (2005) mostrou que Merc sol CH200 aumenta a liberação da citocina IL-4 por macrófagos peritoneais de camundongo, a qual estimula a proliferação de células progenitoras hematopoiéticas e a expansão e o recrutamento de células mielóides em início de diferenciação (OGAWA, 1993; SNOECK, *et al.*, 1996). Se Merc sol possuir esse mesmo efeito sobre os macrófagos do estroma medular, é possível que ele esteja estimulando a proliferação das células CD11b⁺ via IL-4. Outra possibilidade é que o tratamento com Merc sol esteja estimulando a diferenciação de células mielóides. Em cultura celular, depois de diferenciadas, algumas células, como granulócitos e células dendríticas, se desprendem ficando no sobrenadante da cultura (INABA, *et al.*, 1992). Para confirmar essa hipótese, marcadores específicos para células dendríticas e granulócitos devem ser usados.

Caso o medicamento esteja estimulando a diferenciação de células dendríticas, ele pode ser muito útil, pois as técnicas desenvolvidas para desenvolver e estimular células dendríticas são demoradas e caras (SMITS, *et al.*, 2009). As células dendríticas são células consideradas adjuvantes naturais para a imunoterapia em doenças malignas. São extremamente potentes para estimularem células T os quais são ideais para gerarem respostas anti-melanoma e, usá-las na imunoterapia, para o tratamento de neoplasias diversas, incluindo mileoma múltiplo,

uma doença maligna de células B, é altamente promissor (HÁJEK; BUTCH, 2000; YI, 2003).

Após o experimento de co-cultura e tratamento com Merc sol CH200, a análise do marcador CD11b nas células não aderentes da medula óssea não foi alterado. No entanto, quando comparamos os controles das células não aderentes da medula cultivada sozinha com as células não aderentes da medula cultivada com macrófagos, podemos observar uma maior quantidade de células CD11b⁺ no experimento de co-cultura (FIGURA 16).



(*) aumentou significativamente ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 16 –CD11b⁺ EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA NÃO ADERENTES EM CULTURA E CO-CULTURA.

Aparentemente, macrófagos produzem substâncias que estimulam a adesão e consequente proliferação celular. Quando é adicionado Merc sol CH200 ao co-cultivo, a quantidade de células CD11b⁺ não aderidas tende a diminuir, ficando próxima a porcentagem de fluorescência que aparece nas células não aderidas da medula cultivada sozinha. Assim, podemos sugerir que o medicamento Merc sol não exerce sua ação nas células CD11b⁺ da medula óssea em co-cultura, uma vez que o mesmo efeito já está sendo realizado pelos macrófagos. Dessa forma, a ação do Merc sol não é aditiva a capacidade dos macrófagos de estimular a proliferação das células CD11b⁺. Com essa comparação, podemos verificar que o tratamento com Merc sol modula a sua ação sobre a medula óssea de acordo com a situação. Por exemplo, neste caso, se o macrófago por si só já estimula a

proliferação celular, o tratamento com Merc sol CH 200 não aumentaria a proliferação celular, o que poderia ser perigoso no caso de um tratamento, pois proliferação exagerada é característica de células com potencial maligno.

O marcador CD11b não foi alterado significativamente nas células da medula óssea aderentes após co-cultura com macrófagos e tratamento com Merc sol CH200 (dados não mostrados).

Todas as diluições de Merc sol mostram possuir ação sobre as funções de dos macrófagos, alterando a liberação de espécies reativas. Os resultados concluem que em uma situação normal, macrófagos tratados com Merc sol devem ter um balanço de resposta imunológica Th1 ou Th2, provavelmente prevenindo um aumento na concentração de ROS tanto *in vitro* quanto *ex vivo* (diminui O_2^-) e depois da interação com leveduras. Mas quando o estímulo é muito intenso, como após a adição de LPS, IFN- γ ou PMA, ocorre uma diminuição na liberação dos ROS, protegendo as células de danos causados pelos tratamentos. Merc sol pode ainda estar em sinalização celular, como na ativação de NF- κ B, devido ao aumento de NO e H_2O_2 , podendo, então, atuar na coordenação das respostas inflamatórias do organismo. De fato, ao analisar a sua ação sobre as células de medula óssea *ex vivo*, pode-se sugerir que o tratamento com Merc sol induz recrutamento de células $CD3^+$ da medula óssea para a corrente sanguínea, com provável direção ao timo. A ação ou consequência desse tratamento pode estar sobre as integrinas que regulam a adesão das células precursoras sobre o estroma, fazendo com que ocorra uma desadesão destas células. Este efeito também pode ser observado sobre as células $CD11b^+$ após o tratamento *in vitro* da medula óssea. O mesmo efeito modulador observado com macrófagos, pode ser observar após o tratamento da medula com e sem co-cultura com macrófagos, onde o tratamento não intensifica o efeito de desadesão dos macrófagos sobre as células da medula óssea. Assim, pode-se dizer que Merc sol tem a capacidade de modular as respostas das células precursoras e diferenciadas, de acordo com a situação. Essa modulação pelo medicamento pode ser eficiente no tratamento em casos de imunossupressão e autoimunidade, causados pela exposição ao Mercúrio, como descritas por Aronson (2006). Estes resultados, também nos indicam que a ação do medicamento no organismo independe dos macrófagos peritoneais, mas é modulado na presença desses.

6.2.2 *Aconitum napellus*

Para avaliar a capacidade de atividade biológica da diluição homeopática de *Aconitum napellus* (Acon), neste trabalho foi utilizada a potência CH30 do medicamento. Oliveira (2005) mostrou que o tratamento *in vitro* de macrófagos com Acon CH30 aumenta o número de macrófagos com morfologia de ativados. Macrófagos quando ativados, são altamente microbicidas e tumorícidias, podem executar essa função de maneira direta envolvendo a liberação de produtos como radicais de oxigênio e nitrogênio (KLIMP *et al.*, 2002; HONG *et al.*, 2005).

Liberação de NO, O₂⁻ e H₂O₂

Para verificar se Acon CH30 ativa as funções microbicidas e tumorícidias, foi analisada a liberação de NO, H₂O₂ e O₂⁻, após os tratamentos dos macrófagos *in vitro*, *in vitro* com posterior interação com leveduras, e tratamento dos camundongos.

Após tratamento *in vitro* dos macrófagos com Acon CH30, a análise do sobrenadante da cultura mostrou aumento significativo na liberação de NO (FIGURA 17A) em relação ao controle (sem tratamento). O NO produzido por macrófagos possui diversos papéis na imunidade: agente tóxico contra organismo infeccioso (potencial antiviral e antimicrobiano), potencial antitumoral ou imunoregulador (COLEMAN, 2001; CADENAS; CADENAS, 2002; PALUDAN *et al.*, 1999). O NO pode ainda funcionar de uma maneira autóloga diminuindo a expressão da proteína iNOS para prevenir autotoxicidade celular (HAN *et al.*, 2001). Dessa maneira, o tratamento *in vitro* dos macrófagos com Acon CH30 pode resultar em aumento de diversas funções destas células, apenas devido a uma maior liberação do radical NO. O tratamento dos camundongos com Acon CH 30 não alterou significativamente a liberação de NO.

Células fagocíticas podem gerar ROS e RNS em condições fisiológicas ou após estímulos como a fagocitose (HAN *et al.*, 2001). Quando o macrófago realiza fagocitose, ocorre ativação das enzimas iNOS e NOX (produção de NO e O₂⁻, respectivamente), que começam a produzir grandes quantidades de espécies reativas, e parte dessa produção de radicais é direcionada para dentro dos fagossomos com a finalidade de destruição do patógeno (CADENAS; CADENAS,

2002; BROWN; GRIENDLING, 2009). De fato, quando se compara a liberação de NO e O_2^- após interação com leveduras e sem a interação, todos os grupos com leveduras (controle e tratado) mostram aumento na liberação desses radicais.

No entanto, após o tratamento *in vitro* dos macrófagos com Acon CH30 e posterior interação com leveduras a liberação de NO e O_2^- no sobrenadante da cultura foi maior do que no controle (sem tratamento e com leveduras) (FIGURAS 17B e 18A, respectivamente).

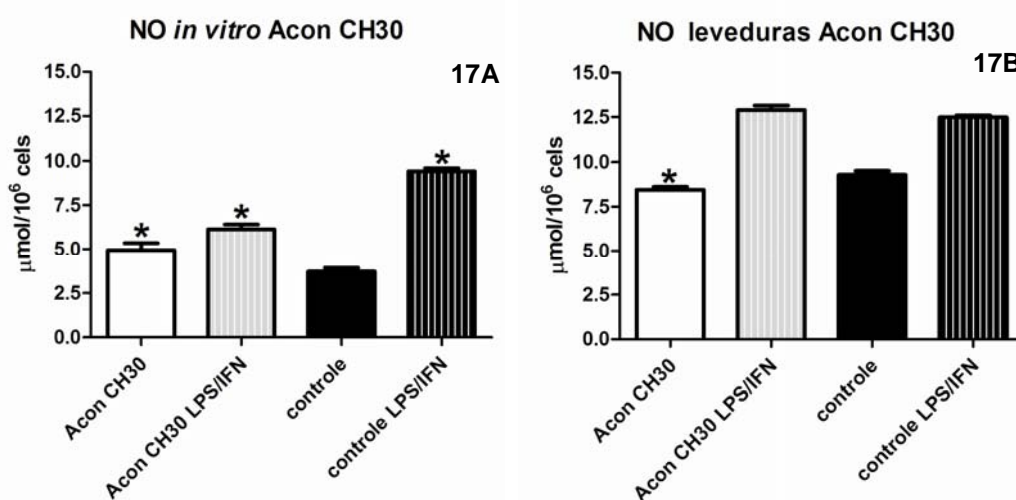


Figura 17A – (*) indica grupos com aumento significativo ($P < 0.05$) comparado ao controle de NO após tratamento *in vitro* de macrófagos com Acon CH30. Figura 17B – (*) indica grupos com diminuição significativa ($P < 0.05$) comparado ao controle após tratamento *in vitro* dos macrófagos seguido de interação com leveduras. Ambos os cultivos por 72 horas. Todos os resultados são expressos como média ± erro padrão.

FIGURA 17 – LIBERAÇÃO DE NO POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO *IN VITRO* COM ACON

Dessa maneira, podemos sugerir que com a fagocitose, Acon CH30 direcione uma maior quantidade de NO e O_2^- produzido para dentro dos fagossomos, contribuindo para uma melhor eficácia da destruição dos patógenos. NO e ROS podem interagir de diferentes maneiras e agir sinergisticamente causando citotoxicidade. Em células que produzem ambos NO e O_2^- num limite próximo de difusão, eles podem reagir para formar peroxinitrito ($ONOO^-$) dentro dos fagossomos. Esse radical é um poderoso oxidante o qual é capaz de nitrar proteína, enfraquecendo, desse modo, a atividade de diferentes enzimas mitocondriais e levando a uma diminuição nos níveis de energia (CADENAS; CADENAS, 2002). Como durante a fagocitose, Acon CH30 mostrou diminuir a liberação de NO e O_2^- no

sobrenadante, pode-se sugerir que o tratamento esteja promovendo uma destruição do mais eficaz do microorganismo, via peroxinitrito.

Após tratamento Acon CH30 também induziu uma redução de O_2^- liberado pelos macrófagos, quando comparado ao controle (FIGURAS 18B e 18C).

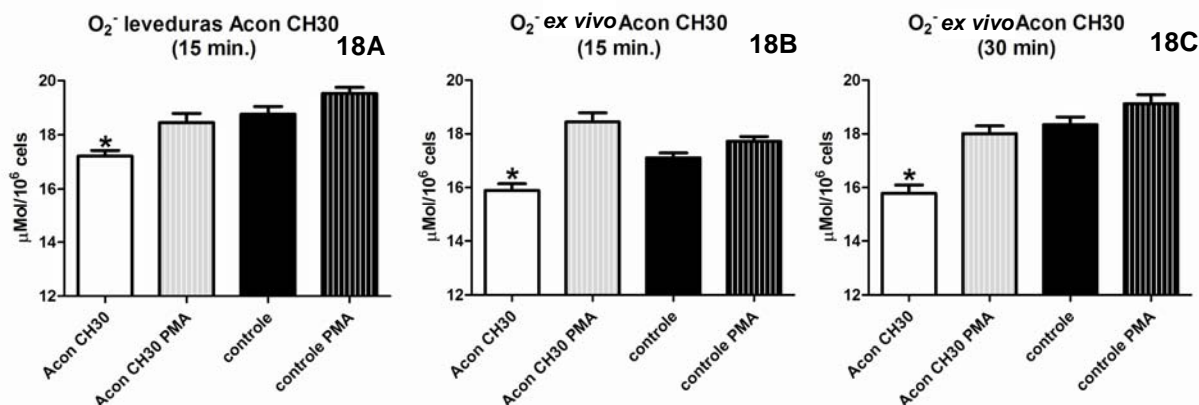


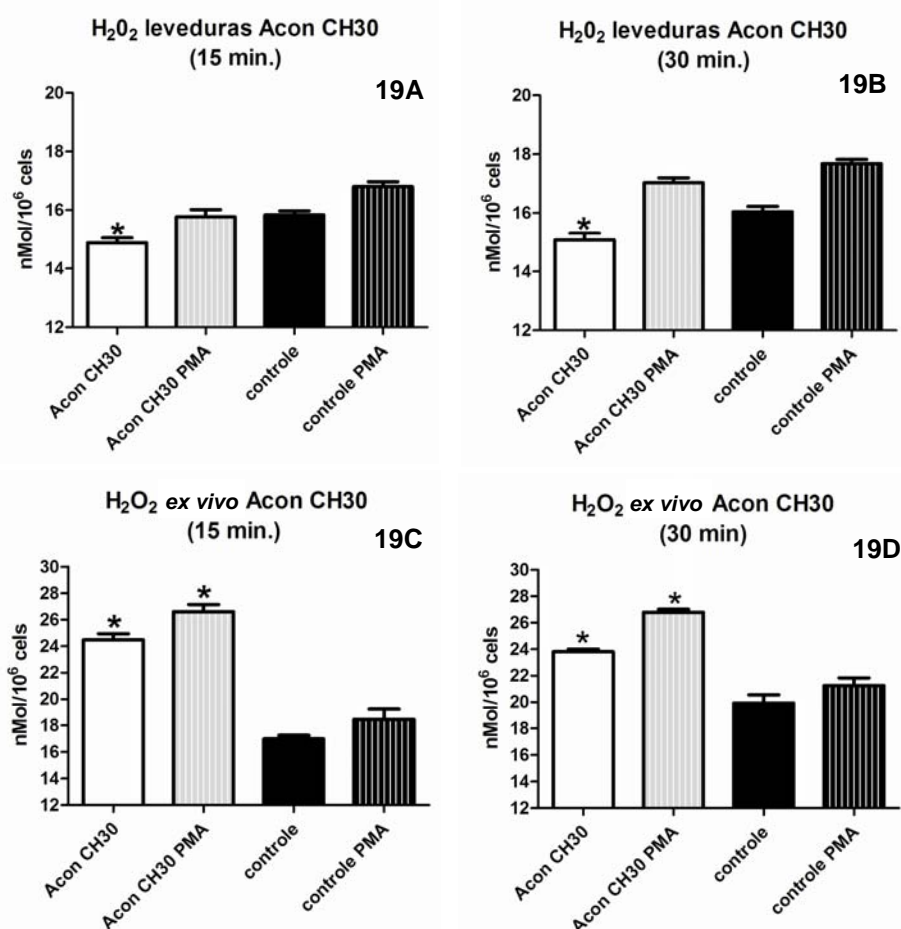
Figura 18A – Gráfico mostrando a diminuição significativa na liberação de O_2^- quando comparado ao controle (*) ($P < 0.05$) após tratamento *in vitro* dos macrófagos, cultivo por 48 horas seguido de interação com leveduras. Figura 18B e 18C – Gráficos mostrando a diminuição significativa na liberação de O_2^- (após 15 e 30 min. de incubação, respectivamente) quando comparado ao controle após tratamento *in vivo*. (*) ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como média ± erro padrão.

FIGURA 18 – LIBERAÇÃO DE O_2^- POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM ACON

É certo que o ânion superóxido produzido pode dismutar espontânea ou enzimaticamente a H_2O_2 (FORMAN; TORRES, 2001). Portanto, uma maior quantidade de O_2^- produzido por macrófagos com Acon pode estar sendo dismutada. De fato, a liberação de H_2O_2 liberado nestas células foi maior do que no controle. (FIGURAS 19C e 19D), Assim pode-se sugerir que o medicamento esteja favorecendo a formação de H_2O_2 . Como O_2^- não é permeável a membrana celular, o produto da atividade da NOX somente pode modular vias de sinais intracelulares, uma vez que este seja convertido a H_2O_2 , o qual pode difundir-se livremente através das membranas. Este radical pode funcionar como segundo mensageiro dentro da própria célula produtora, ativando vias de sinalização, como a do NF- κ B, ou ainda funcionar como sinalizador intercelular (LI; KARIN, 1999; RETH, 2002). Então, tratamento dos camundongos com Acon CH30 estaria aumentando a sinalização celular via a produção de H_2O_2 . Uma vez que esse radical por si só, não tem grande potencial destrutivo, H_2O_2 produzido e liberado por macrófagos ativados é

primeiramente proposto como ativador de macrófagos e linfócitos e não como destruidor de microorganismos (RETH, 2002).

Apesar de tratamento dos camundongos com Acon CH30 estimular a liberação de uma maior quantidade de H_2O_2 pelos macrófagos, após o *tratamento in vitro* destas células com posterior interação com levedura, o tratamento com Acon CH30 mostrou diminuir significativamente a quantidade de H_2O_2 liberada no sobrenadante da cultura de macrófagos (FIGURA 19A e 19B).



Figuras 19A e 19B – gráficos mostrando a diminuição significativa na liberação de H_2O_2 (após os tempos de 15 e 30 min.) quando comparado ao controle após tratamento *in vitro* dos macrófagos e cultivo por 48 horas seguido de interação com leveduras; (*) ($P < 0.05$). Figura 19C e 19D – gráficos mostrando o aumento significativa na liberação de H_2O_2 (após os tempos de 15 e 30 min.) quando comparado ao controle após tratamento *in vivo*; (*) ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como $\text{media} \pm \text{erro padrão}$.

FIGURA 19 – LIBERAÇÃO DE H_2O_2 POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM ACON

Como a maior fonte de H_2O_2 na célula vem da dismutação espontânea ou enzimática de O_2^- (VEAL *et al.*, 2007) é esperado que em uma situação onde O_2^-

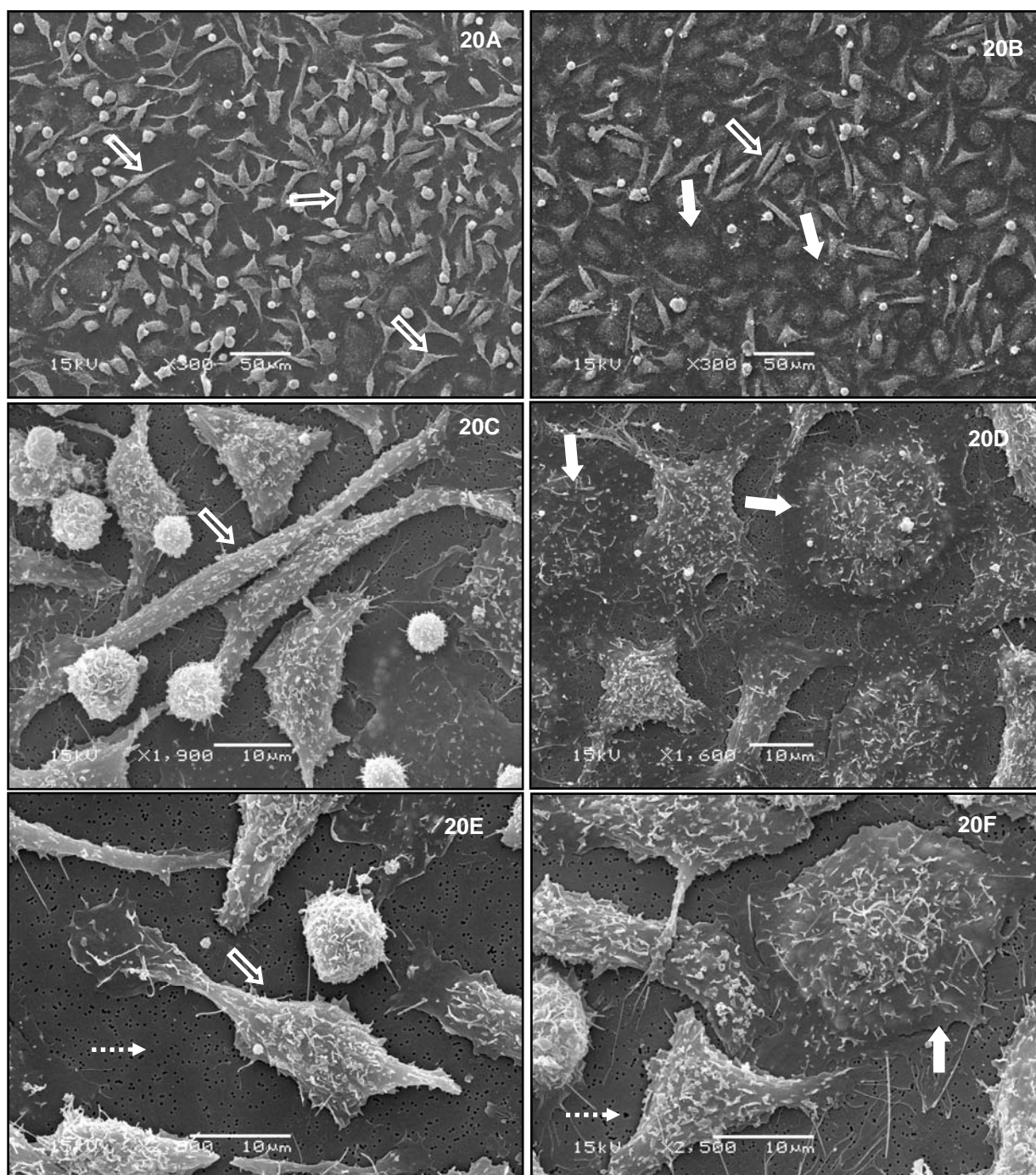
esteja sendo utilizado para formar outro intermediário, ocorra uma diminuição na produção de H_2O_2 no sistema. Neste caso, macrófagos tratados com Acon CH30 e interagidos com leveduras diminuíram a liberação de H_2O_2 , porque, como dito anteriormente, o O_2^- produzido nestas células provavelmente esteja reagindo com NO dentro dos fagossomos, formando $ONOO^-$, radical com uma maior atividade citotóxica.

O tratamento *in vitro* dos macrófagos com Acon CH30 não alterou significativamente a liberação de H_2O_2 e O_2^- no sobrenadante da cultura (dados não mostrados).

Com esses resultados, podemos sugerir que o tratamento com o medicamento Acon CH30 modula a liberação de radicais de acordo com a prioridade dos macrófagos. Diminuindo a sua liberação quando estes são requisitados na destruição de patógenos ou liberados numa forma menos reativa para realizar sinalização celular.

MEV de macrófagos em co-cultura

Após 96 horas, a membrana da placa de co-cultura foi retirada e processada para MEV. A maioria dos macrófagos tratados com Acon CH30 mostrou morfologia de ativado, diferente do controle, onde a maioria apresentou morfologia de residente (FIGURA 20). Em 2005, Oliveira mostrou que o tratamento *in vitro* por 48h com Acon CH30 ativou morfologicamente macrófagos peritoneais, aumentando a quantidade de macrófagos ativados no grupo tratado. Macrófagos ativados podem secretar diversas substâncias, como ROS, RNS, citocinas e fatores de crescimento, que possuem vários efeitos sobre as demais células do organismo (GORDON, 2003).

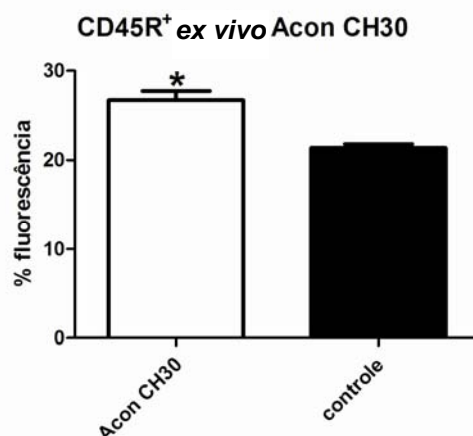


MEV de macrófagos co-cultivados com medula óssea por 96 horas. A, C e E- macrófagos controle, A, D e F - tratados com Acon CH30. Setas abertas = macrófagos residentes; setas fechadas = macrófagos ativados; setas tracejadas = poros da membrana

FIGURA 20 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM ACON CH30 EM CO-CULTURA

Imunofenotipagem das células da medula óssea

Após tratamento dos camundongos, a imunofenotipagem mostrou que o tratamento com Acon CH 30 aumenta significativamente a expressão do marcador CD45R na medula (FIGURA 21).



(*) aumentou significativamente em relação ao controle ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 21 – CD45R⁺ EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO *IN VIVO* COM ACON

CD45R (B220) é uma das formas com alto peso molecular de uma série de glicoproteínas transmembranas conhecidas como CD45, a qual é expressa em todas as células linfóides. No entanto, CD45R é a primeira molécula específica de células B expressa durante sua diferenciação, sendo atribuída como molécula marcadora de centro de germinação de células B, e continua sendo expressa (em menor quantidade) até a célula madura e ativada. CD45R está relacionado com a transdução de sinal na fase inicial de diferenciação das células B e sua proliferação mediada por IL-4 (COFFMAN, 1982; HASEGAWA, *et al.*, 1990; MONROE; DORSHKIND, 2007).

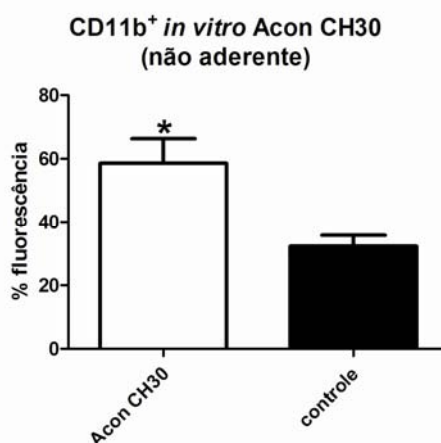
Com esse resultado, pode-se dizer que este medicamento possui ação nas células precursoras da linhagem de células B, podendo influenciar a imunidade inata e adaptativa através do aumento destas células apresentadoras de antígeno. (PARKIN; COHEN, 2001) Em 2005, Oliveira mostrou que o tratamento de macrófagos peritoneais com Acon CH30 aumenta a liberação da citocina IL-4. Como IL-4 está envolvida na proliferação e na formação inicial das colônias de células B, pode-se sugerir que Acon CH30 esteja estimulando a produção dessa citocina pelos

macrófagos do camundongo e conseqüentemente, as células CD45R⁺ em uma maneira sistêmica, estimulando, provavelmente, uma resposta imunológica Th2.

Os demais marcadores da linhagem hematopoiética não foram alterados após tratamento dos camundongos com Acon CH30.

CD11b⁺ em células de medula óssea

O tratamento com Acon CH30 aumentou a expressão de CD11b⁺ nas células não aderentes do cultivo de medula óssea (FIGURA 22).



(*) aumentou significativamente em relação ao controle ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

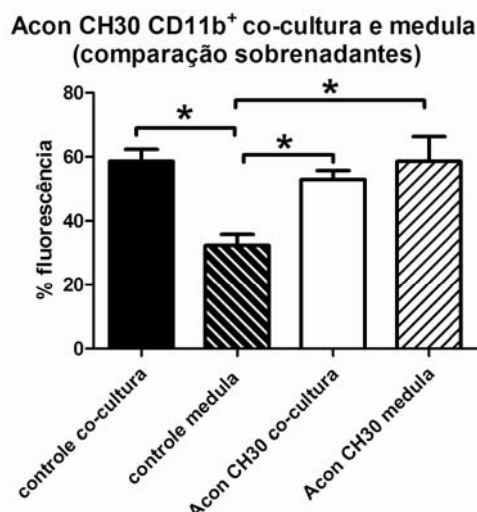
FIGURA 22 – CD11b⁺ EM CÉLULAS NÃO ADERENTES DE MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO *IN VITRO* COM ACON

CD11b esta evolutivamente relacionada ao receptor integrina que medeia adesão celular à matriz extracelular durante o desenvolvimento e reparo tecidual (GEORGAKOPOULOS, *et al.*, 2008). Nas CTHs CD11b é um dos primeiros marcadores detectados durante a diferenciação de monócitos e granulócitos nos estágios mielocíticos e monoblásticos (ARNAOUT, 1990; KISHIMOTO, *et al.*, 1990, YANG, *et al.*, 2007). As CTHs para se diferenciarem precisam estar aderidas ao estroma, diferentemente da proliferação (INABA, *et al.*, 1992). Uma vez que o tratamento das células da medula óssea com Acon CH30 aumentou a porcentagem de células CD11b⁺ não aderentes, é provável que o medicamento esteja estimulando a proliferação das células. No entanto, outra possibilidade é que o tratamento com Acon esteja estimulando a diferenciação de células mielóides. Em cultura celular, depois de diferenciadas, algumas células, como granulócitos e células dendríticas, se desprendem ficando no sobrenadante da cultura (INABA, *et*

al., 1992). Para confirmar essa hipótese, marcadores específicos para células dendríticas e granulócitos devem ser usados. Oliveira (2005) mostrou que Acon CH30 aumenta a liberação da citocina IL-4 por macrófagos peritoneais de camundongo, a qual estimula a expansão e o recrutamento de células mielóides precoce (SNOECK, *et al.*, 1996). Se Acon CH 30 possuir esse mesmo efeito sobre os macrófagos do estroma medular, é possível que ele esteja estimulando a diferenciação das células CD11b⁺ por meio da produção de IL-4. Células-tronco cultivadas com fatores de crescimento e diferenciação adequados, podem se diferenciar em praticamente todos os tipos celulares sanguíneos. Em meio de cultura contendo GM-CSF, por exemplo, um fator de crescimento para granulócitos e monócitos produzidos por macrófagos, podem se diferenciar em células dendríticas, na presença de IL-4 (BONTKES, *et al.*, 2002; GORDON; TAYLOR, 2005). Assim, Acon CH30 pode ter estimulado a proliferação de alguns tipos celulares presentes no sobrenadante da cultura da medula e/ou a diferenciação das células CD11b⁺ em células dendríticas.

Células dendríticas são células que ligam o sistema imunológico inato ao adaptativo, devido à capacidade de reconhecer o antígeno, processá-lo e apresentá-lo aos linfócitos T (VARIN; GORDON, 2009; MELLMAN, 2005). Caso o medicamento esteja estimulando a diferenciação de células dendríticas, ele pode ser muito útil, pois as técnicas usadas para diferenciar e estimular células dendríticas são demoradas e caras (SMITS, *et al.*, 2009). As células dendríticas são células consideradas o adjuvante o mais natural para a imunoterapia em doenças malignas, pois são extremamente potentes para estimularem células T (HÁJEK; BUTCH, 2000; YI, 2003).

O marcador CD11b não foi alterado significativamente nas células da medula óssea co-cultivadas com macrófagos. No entanto, quando se comparam as células não aderentes da co-cultura e do cultivo de medula, pode-se observar uma quantidade próxima entre as porcentagens de marcação CD11b⁺ (FIGURA 23). Sendo que estas células da co-cultura, quando comparadas ao controle do cultivo da medula, têm também uma maior porcentagem significativa.. Aparentemente, a presença dos macrófagos induz uma proliferação celular.



(*) aumentou significativamente ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como $\text{media} \pm \text{erro padrão}$.

FIGURA 23 – CD11b⁺ DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA NÃO ADERENTES EM CULTURA E CO-CULTURA

Apesar de os macrófagos da co-cultura com Acon CH30 terem sido morfológicamente ativados, a marcação CD11b⁺ das células da medula da co-cultura praticamente não sofreu alteração quando comparado ao seu controle. No entanto, quando as células da medula óssea receberam Acon CH30, a porcentagem de marcação aumentou nas células não aderentes, ficando próxima à porcentagem de marcação presente no sobrenadante da co-cultura. Assim, podemos sugerir que o tratamento da medula óssea com Acon CH30 possui o mesmo efeito estimulante sobre essas células que os macrófagos. No entanto, as substâncias liberadas pelos macrófagos ativados com Acon CH30 não alteram o marcador CD11b.

Os estudos aqui descritos com o medicamento Acon CH30 mostram sua ação sobre células diferenciadas (neste caso, macrófagos) e células precursoras do sistema imunológico. Acon CH30 ativou macrófagos modulando a produção de espécies reativas de acordo com a necessidade dessas células, estimulou na medula óssea de camundongos tratados, o aumento de marcadores específicos da linhagem de células B e da linhagem mielocítica *in vitro*, independente da presença de macrófagos. Assim, com esses resultados podemos dizer que Acon CH30 possui diferentes resultados com diferentes sistemas, influenciado ou não pela presença de macrófagos.

6.2.3 *Atropa Belladonna* (Beladona)

Homeopaticamente, Beladona também é muito utilizada em processos inflamatórios, aumentando o sistema imunitário (PEDALINO *et al.*, 2004). Dessa forma, nosso modelo experimental com macrófagos poderá ser útil para avaliar a ação desse medicamento. Neste trabalho, foram utilizadas as potências CH6, 30 e 200 para a análise dos radicais *in vitro* e CH200 para tratamento dos camundongos, *in vitro* da medula óssea e co-cultura. Muitos tipos celulares envolvidos na imunidade e inflamação, como macrófagos, sintetizam óxido nítrico. (CADENAS; CADENAS, 2002). Assim, este foi o nosso primeiro parâmetro utilizado para analisar a ativação dos macrófagos peritoneais por Bell.

Liberação de NO, O_2^- e H_2O_2

No sistema imunológico, NO é gerado durante respostas imunológicas e inflamatórias, podendo funcionar como agente tóxico em direção a organismos infecciosos, indutor ou supressor da apoptose, ou imunoregulador. (COLEMAN, 2001) Após o tratamento *in vitro* com Bell, os grupos de macrófagos tratados com Bell CH6 e 200 demonstraram um aumento significativo na liberação de NO no sobrenadante da cultura (FIGURA 24).

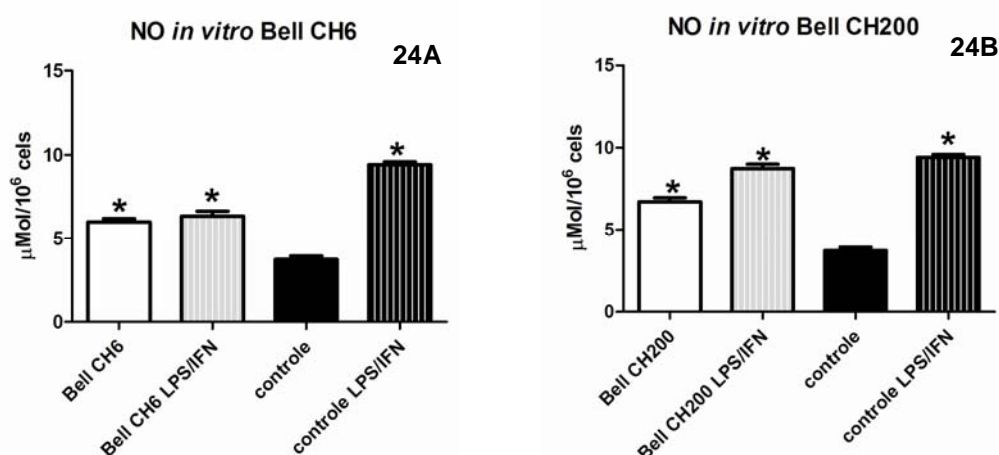
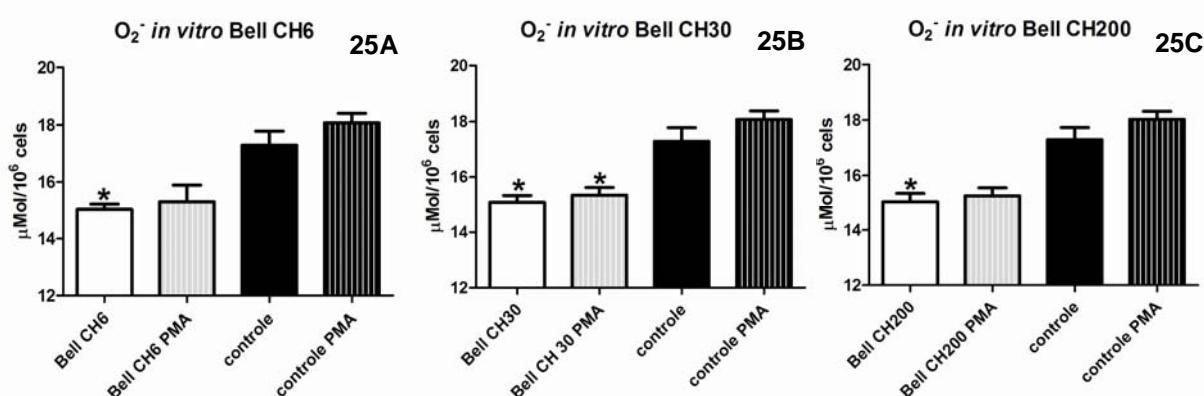


Figura 24A e 24B – (*) indicam grupos com aumento significativo ($P < 0.05$) na liberação de NO, quando comparado ao controle, após tratamento *in vitro* com CH6 e CH12, respectivamente, e cultivo por 72 horas. Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 24 – LIBERAÇÃO DE NO POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO *IN VITRO* COM BELL

O tratamento com Bell CH30 não alterou a liberação de NO. A liberação de NO também não foi alterada após os tratamentos *in vitro* com posterior interação com leveduras e *ex vivo* com nenhuma das potências (dados não mostrados).

Uma vez que Bell CH6 e 200 ativam a liberação desse radical *in vitro*, vários parâmetros dos macrófagos podem estar sendo alterados. NO pode reagir com O_2^- , NO_2 e metais de transição, e cada um dos produtos gerados tem suas características fisiológicas. O_2^- produzido pela redução do O_2 tem um elétron desemparelhado que pode rapidamente combinar com o elétron desemparelhado no NO, formando $ONOO^-$ (GRISHAN, *et al.*, 1999). Esse tipo de reação, comum em células fagocíticas e ativadas, pode estar acentuada em macrófagos tratados com Bell CH6 e CH200, pois a liberação do superóxido no sobrenadante da cultura diminuiu após os tratamentos, quando comparada ao controle (FIGURA 25A e 25C, respectivamente).



Gráficos 25A, 25B e 25C mostrando a diminuição significativa na liberação de O_2^- quando comparado ao controle (*) ($P < 0.05$), após tratamento *in vitro* dos macrófagos com as potências CH6, CH30 e CH200, respectivamente e cultivo por 48 horas. Todos os resultados são expressos como média ± erro padrão.

FIGURA 25 – LIBERAÇÃO DE O_2^- POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM BELL

Ao analisarmos os gráficos de liberação de NO e O_2^- , podemos verificar que a quantidade de NO liberado no controle é bem menor que a de O_2^- . Assim, podemos sugerir que os tratamentos induzem um aumento de NO para que esses possam reagir com o O_2^- liberado, “seqüestrando-o” do meio. $ONOO^-$ formado dessa reação reage com biomoléculas, como proteínas, lipídios e DNA, resultando em alterações enzimáticas e em vias de sinalização (DENICOLA; RADI, 2005), além de ser sugerido como um detoxificante por ser uma via de remover O_2^- (GRISHAN, *et al.*, 1999).

Após o tratamento *in vitro* dos macrófagos com Bell CH30 a liberação de O_2^- também foi diminuída no sobrenadante dos macrófagos (FIGURA 25B). No entanto, essa diminuição provavelmente não envolve a formação de $ONOO^-$, pois não houve alteração de NO quando macrófagos foram tratados com Bell CH30. Após o tratamento *in vitro* com posterior interação com leveduras, esse efeito de redução do O_2^- liberado também foi observado após o tratamento com CH30 (FIGURA 26). A enzima responsável pela produção de superóxido (NOX2) é ativa com o estímulo da fagocitose. Esse processo faz com que a produção desse radical seja direcionada para o interior das vesículas onde está o patógeno. De fato, quando se comparam os experimentos com e sem leveduras, pode-se verificar uma maior quantidade de O_2^- liberado por todos os grupos, quando o macrófago realiza a interação. Assim, podemos sugerir que Bell CH30 direciona uma parte maior do que a do controle de O_2^- produzido para dentro dos fagossomos, com provável aumento no interior das vesículas, colaborando para uma defesa mais eficaz.

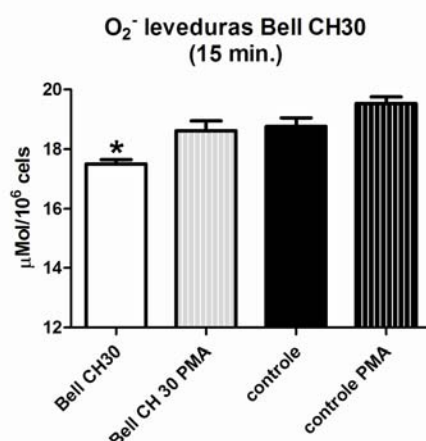
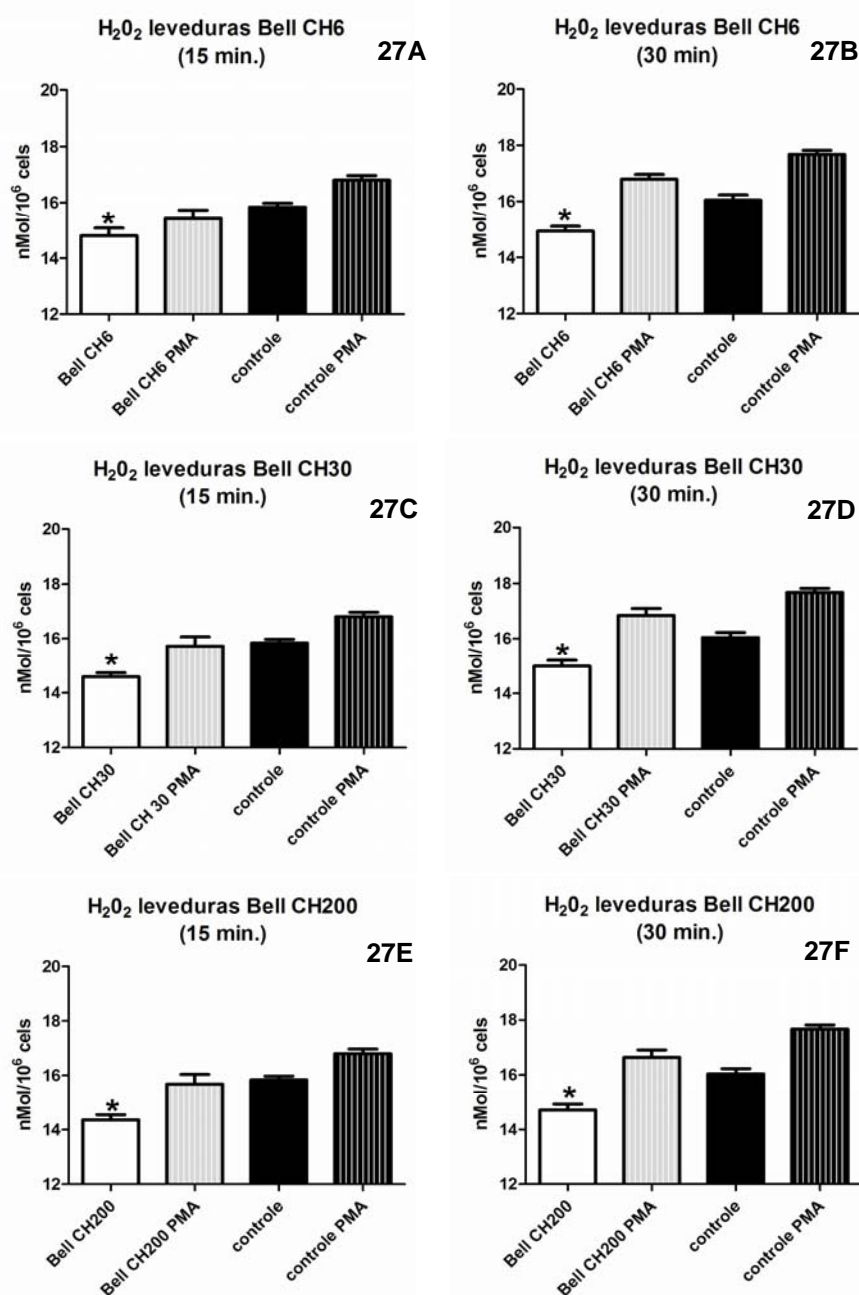


Gráfico mostrando a diminuição significativa na liberação de O_2^- quando comparado ao controle, após tratamento *in vitro* dos macrófagos seguido de interação com leveduras; (*) ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 26 – LIBERAÇÃO DE O_2^- POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM BELL

Resultado semelhante foi descrito com neutrófilos estimulados com zimozan os quais tiveram uma diminuição na produção de radicais livres de oxigênio após tratamentos com Bell (BELLAVITE, *et al.*, 2006). Uma vez que H_2O_2 origina-se da dismutação espontânea ou enzimática de O_2^- , como consequência da diminuição de O_2^- a liberação de H_2O_2 após a interação com leveduras e tratamento com o

medicamento Bell CH30 também foi diminuída (FIGURAS 27C e 27D). Os medicamentos Bell CH6 e 200 também mostraram reduzir a liberação de H_2O_2 após a interação com leveduras (FIGURA S 27A e 27B, 27E e 27F), sem, no entanto, diminuir a liberação de O_2^- .



Gráficos mostrando a diminuição significativa na liberação de H_2O_2 (15 e 30 min.) quando comparado ao controle após tratamento *in vitro* dos macrófagos seguido de interação com leveduras com as potências CH6 (A e B), CH30 (C e D), CH200 (E e F); (*) ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 27 – LIBERAÇÃO DE H_2O_2 POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM BELL.

Dessa forma, podemos concluir que a redução de H_2O_2 não foi uma consequência da redução da sua fonte, mas do seu provável uso para a defesa da célula. De fato, H_2O_2 juntamente com íons cloreto pode ser convertido em ácido hipocloroso (HOCl), pela mieloperoxidase. HOCl é um oxidante antimicrobica altamente eficaz (BROWN; GRIENDLING, 2009). Assim, o H_2O_2 produzido nos macrófagos tratados com Merc sol pode estar sendo convertido ao agente bactericida HOCl no fagossomo, aumentando a destruição e conseqüentemente diminuindo a liberação extracelular desse reativo no sobrenadante da cultura. Quando comparamos os experimentos com e sem leveduras, podemos observar uma diminuição na liberação de H_2O_2 por todos os grupos, sendo essa diminuição maior nos grupos tratados. Dessa forma, os medicamentos aumentariam a eficácia da destruição do microorganismo, direcionando uma maior parte da produção do radical para dentro do fagossomo, sem ser necessária uma maior produção, evitando, dessa forma, um estresse oxidativo na célula. A liberação de H_2O_2 pode estar diminuída após os tratamentos com Bell CH6, 30 e 200 devido também a uma maior difusão desse radical para o interior da célula. Como o H_2O_2 pode difundir-se livremente através das membranas, este radical pode funcionar como segundo mensageiro dentro da própria célula produtora, ativando vias de sinalização, como a do NF- κ B (LI; KARIN, 1999; RETH, 2002). A liberação de H_2O_2 após os tratamentos *in vitro* e em análise *ex vivo* com Bell não mostrou diferença significativa na liberação (dados não mostrados). Um esquema sumarizando os efeitos *in vitro* dos tratamentos com Bell CH6, 30 e 200 sobre a liberação dos radicais estão apresentados nas figuras 28.e 29.

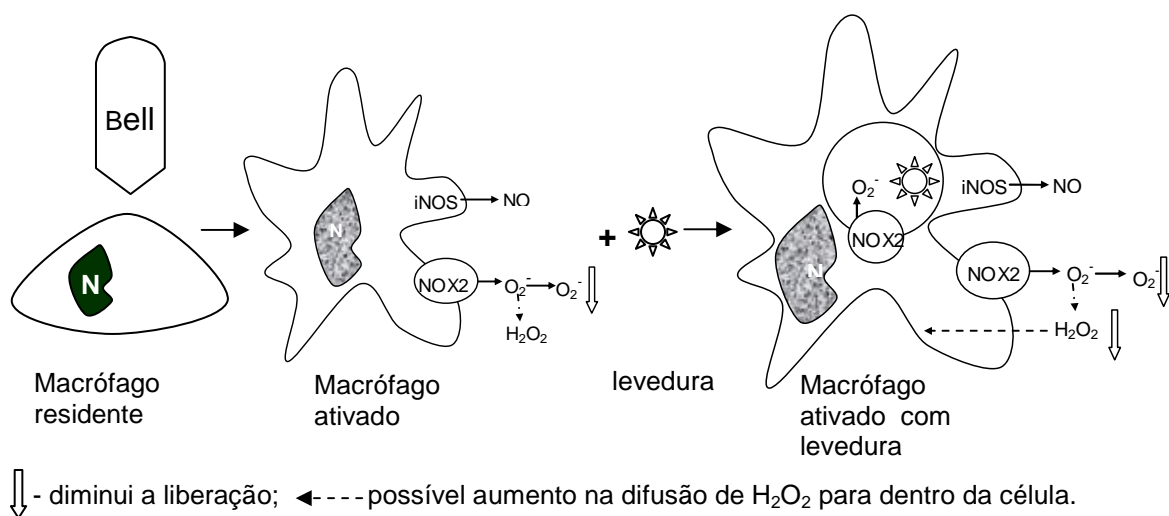


FIGURA 28 – EFEITOS DO TRATAMENTO COM BELL CH30 *IN VITRO* E *IN VITRO* COM POSTERIOR INTERAÇÃO COM LEVEDURA

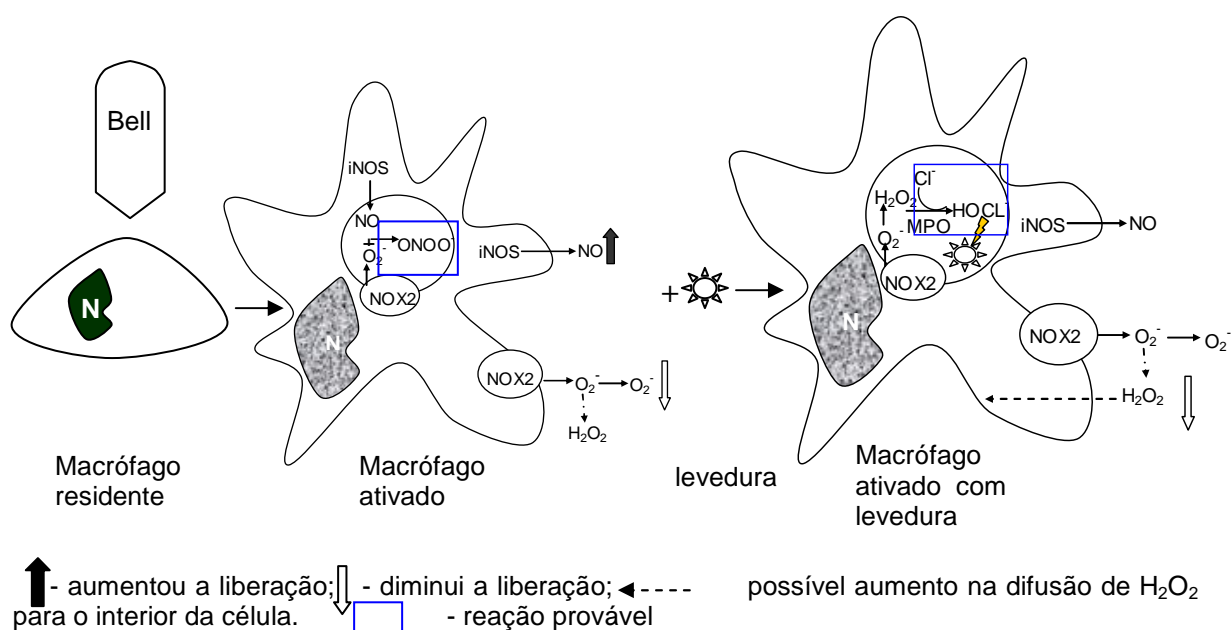
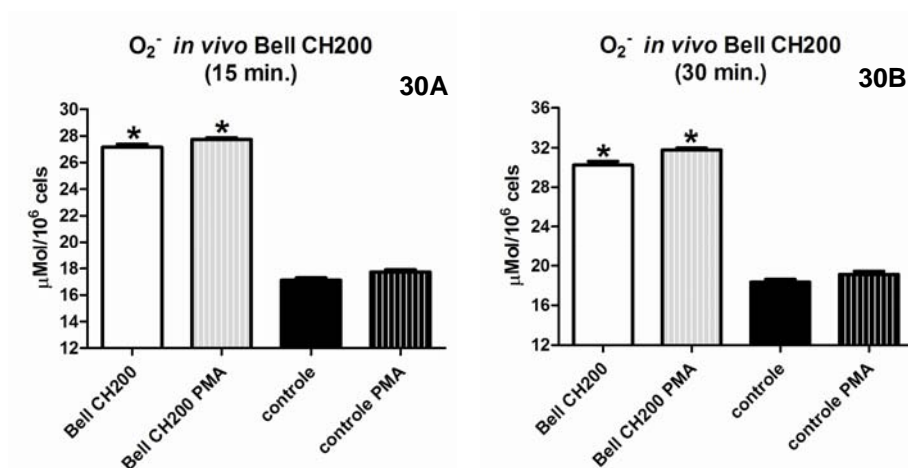


FIGURA 29 – EFEITOS DO TRATAMENTO COM BELL CH6 E 200 *IN VITRO* E *IN VITRO* COM POSTERIOR INTERAÇÃO COM LEVEDURA

tratamento dos camundongos, foi realizado apenas com Bell CH200. A análise da liberação de espécies reativas pelos macrófagos mostrou que Bell CH200 possui efeito apenas na liberação O_2^- (FIGURA 30). Os demais radicais não foram alterados significativamente por esse tratamento.



Figuras 30A e 30B – gráficos mostrando aumento significativo na liberação de O_2^- (após 15 e 30 min. de incubação) quando comparado ao controle após tratamento *in vivo* (*) ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

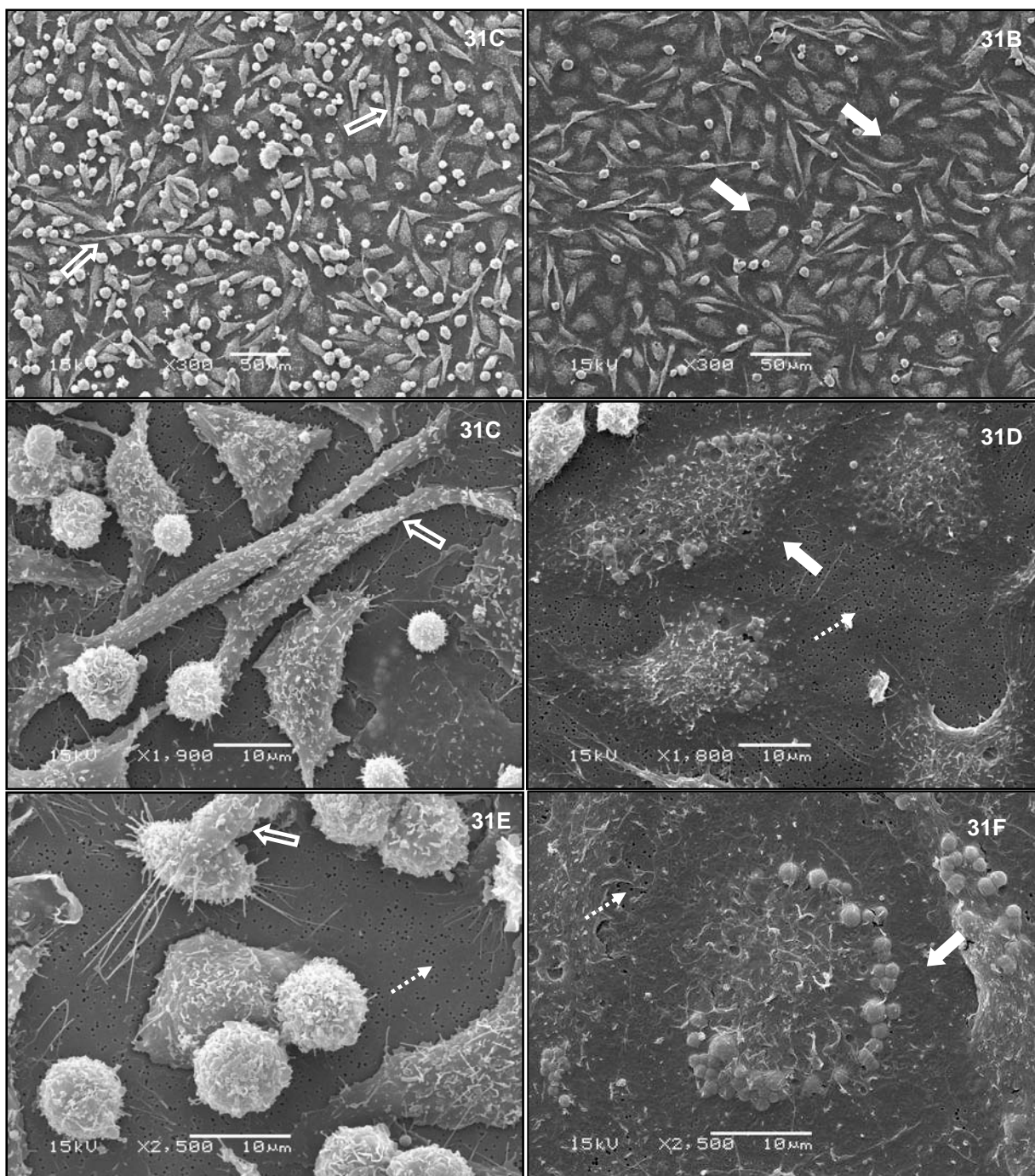
FIGURA 30 – LIBERAÇÃO DE O_2^- POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO *IN VIVO* COM BELL

O primeiro produto da redução do O_2 é o O_2^- , o qual é liberado fora da célula ou dentro de fagossomos. O_2^- além de seu papel na defesa do organismo, é responsável pela sinalização celular. Ele pode especificamente e reversivelmente reagir com proteínas, alterando sua atividade, localização e meia-vida (BROWN; GRIENDLING, 2009). Com o aumento na produção desse radical, podemos dizer que o tratamento com Bell CH200 atua na principal fonte de O_2^- das células fagocíticas, enzima NOX2. A defesa é a função chave da NOX2. Apesar do O_2^- ser a espécie reativa produzida por NOX2, o modo como ele atua na morte de parasitas não está bem definido. Suas ações tóxicas aparentemente ficam restritas a ambiente de baixo pH, ou quando se associa a outros reativos, como NO, ou sofre a dismutação para H_2O_2 , onde esse se associa com outros componentes tornando-se altamente eficaz contra parasitas. No entanto, a ativação da NOX2 pode ter outros papéis tão importantes quanto à defesa do organismo. Uma vez que ROS tem sido relacionados com doenças inflamatórias, parece controverso associar a ativação dessa enzima com propriedades antiinflamatórias. Mas diversos estudos têm

descoberto essa nova função (BEDARD; KRAUSE, 2007). Estudos onde a ativação da NOX2 e consequente produção de ROS controla ou diminui a severidade de artrite reumatóide, por exemplo, por inibir a ativação de células T envolvidas na resposta inflamatória, parecem ser promissor para o tratamento dessa doença (OLOFSSON, *et al.*, 2002; 2007). Importante função da NOX2 ativada pode ser observado também em experimental infecção pulmonar pelo vírus da influenza, onde camundongos deficientes dessa enzima possuem elevado infiltrado inflamatório e liberação acelerada do vírus (BEDARD; KRAUSE, 2007). Assim, a ativação da NOX2 pelo tratamento dos camundongos com Bell CH200 poderia ser útil no tratamento de reações hiperinflamatórias, como nestes casos acima. De fato, desde Toledo (1910) tem-se relatos de que Bell é utilizada para o tratamento de gripes e reumatismo.

MEV de macrófagos em co-cultura

Após 96 horas, a membrana da placa de co-cultura foi retirada e processada para MEV. Os macrófagos tratados com Bell mostram uma morfologia de ativado, diferente do controle, o qual apresentou morfologia de residente (FIGURA 31). De fato, tratamento *in vitro* por 48h com Bell CH200 ativou morfologicamente macrófagos (OLIVEIRA, 2005), aumentando de 35, 40% no controle para 47,0 % no tratado.



MEV de macrófagos co-cultivados com medula óssea por 96 horas. A, C e E- macrófagos controle, B D e F - tratados com Bell CH200 Setas abertas= macrófagos residentes; macrófagos fechadas= ativados; setas tracejadas = poros da membrana

FIGURA 31 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM BELL CH200 EM CO-CULTURA

Imunofenotipagem das células da medula óssea

Após o tratamento dos camundongos, a medula óssea foi processada e incubada com anticorpos para a imunofenotipagem. A análise em citometria de fluxo mostrou que o tratamento com Bell CH200 diminuiu a expressão do marcador Ly-6G e aumentou CD45R (FIGURA 32). Os demais marcadores não mostraram alteração significativa na porcentagem de marcação.

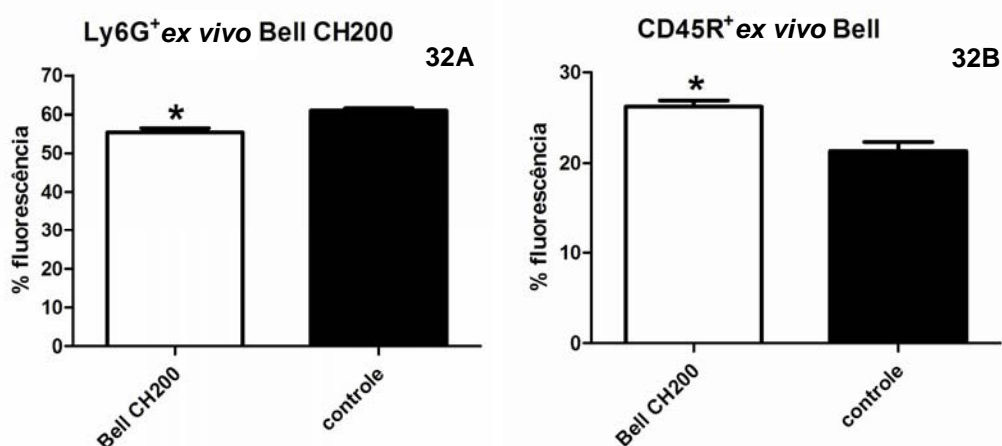


Gráfico 32A (*) indica diminuição significativa e gráfico 32B (*) indica aumento significativo em relação ao controle ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 32 – Ly-6G⁺ E CD45R⁺ EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO *IN VIVO* COM BELL

O antígeno Ly-6G, anteriormente nomeado como Gr-1, é um antígeno de diferenciação mielóide. A expressão de Ly-6G aumenta durante a diferenciação de granulócitos com alta expressão sobre granulócitos maduros. Sua expressão é transitória durante diferenciação de monócitos, mas não é detectável em monócitos maduros. Ly-6G não é expresso em células progenitoras hematopoiéticas (FLEMING, *et al.*, 1993; HESTDAL, *et al.*, 1991). Uma característica da resposta inata é a ativação e o recrutamento de neutrófilos ao local da infecção para eliminar o patógeno. No início da infecção, macrófagos presentes no local e estimulados por fagocitose ou por outros mecanismos, secretam substâncias, como citocinas e os fatores de crescimento de granulócitos-monócitos (GM-CSF) e granulócitos (G-CSF), que estimula a produção e maturação de neutrófilos nos precursores mielóides da medula e acelera sua liberação na corrente sanguínea (DALE *et al.*, 2008; PARKIN; COHEN, 2001). Em 2004, Pedalino *et al.*,

demonstraram que tratamento em água de beber com um mix comercial de Belladonna aumentou a porcentagem de polimorfonuclear no lavado peritoneal de camundongo, além de aumentar a sua atividade, após sofrerem peritonite induzida. Assim, podemos sugerir que o tratamento com Bell CH200 estimula a diferenciação e recrutamento de neutrófilos da medula óssea, para os locais de defesa, diminuindo na sua detecção. Esse recrutamento dos neutrófilos pode resultar em defesa mais eficaz.

A imunofenotipagem da medula óssea revelou que o tratamento com Bell CH 200 aumenta significativamente o marcador CD45R. CD45R (B220) é uma das formas com alto peso molecular de uma série de glicoproteínas transmembranas conhecidas como CD45, a qual é expressa em todas as células linfóides. No entanto, CD45R é a primeira molécula específica de células B expressa durante a diferenciação. É atribuída como molécula marcadora de centro de germinação de células B e continua sendo expressa (em menor quantidade) até a célula B madura e ativada. (COFFMAN, 1982; HASEGAWA, *et al.*, 1990; MONROE; DORSHKIND, 2007). Estimulando a expressão desse marcador, Bell CH200 pode estar contribuindo para a diferenciação das células B e consequente estímulo da resposta imunológica adaptativa. Esses resultados de ação de Bell CH200 mostram um provável efeito sobre as células mais diferenciadas, uma vez que esses dois marcadores tem maior expressão em células já no final de diferenciação.

CD11b⁺ em células de medula óssea

Após o tratamento com Bell CH200 do co-cultivo de células de medula óssea não houve diferença significativa na detecção dos marcadores CD11b (dados não mostrados).

A tintura mãe da Atropa Belladonna, preparada homeopaticamente, é muito usada na homeopatia em processos com características de inflamatórios. Assim, objetivamos avaliar as ações de diluições usadas na clinica em macrófagos e posteriormente em células de medula óssea. Bell CH6, e 200 mostraram possuir efeito estimulatório *in vitro* sobre a liberação de NO, o qual pode ser usado tanto na defesa, quanto na sinalização celular. Esta indução sobre esse radical *in vitro* mostra que além de ativar morfologicamente macrófagos, Bell possui ação sobre as funções efetoras dos macrófagos. Uma vez que Bell CH6 e 200 exerceram um efeito *in vitro*

de redução do O_2^- liberado nos macrófagos ativados pelo tratamento, pode-se sugerir que esse radical produzido está reagindo com o NO formado, produzindo $ONOO^-$, o qual pode atuar tanto na morte de parasitas como sinalizador e um detoxificante (GRISHAN, *et al.*, 1999). Essa provável reação e formação de peróxinitrito não acontecem com o tratamento por Bell CH30, pois este medicamento não alterou a liberação de NO. Como não houve aumento na liberação de H_2O_2 , este medicamento deve estar atuando na redução de O_2^- por ação na enzima NOX2 e não na dismutação deste. Efeito na liberação de O_2^- e H_2O_2 por Bell CH30 também pode ser observado após a interação de macrófagos com leveduras. Este medicamento induziu uma diminuição na liberação desses radicais, provavelmente por direcionar O_2^- para o interior dos fagossomos, melhorando a eficácia da destruição dos patógenos. Bell CH6 e 200 também mostraram reduzir a liberação de H_2O_2 após a interação com leveduras sem, no entanto, diminuir a liberação de O_2^- . Provavelmente a redução de H_2O_2 não foi uma consequência da redução da sua fonte, como com Bell CH30, mas do seu uso para a defesa da célula. Por exemplo, H_2O_2 juntamente com íons cloreto pode ser convertido em HOCl, poderoso antimicrobiano (BROWN; GRIENDLING, 2009). De qualquer forma, as 3 potências usadas de Bell parecem atuar no aumento das defesas dos macrófagos. Diferentemente de todos os resultados mostrados *in vitro*, Bell CH200 mostrou apenas ação sobre o aumento na liberação de O_2^- . Dessa forma, este medicamento pode estar atuando diretamente na ativação da enzima NOX2. A ativação dessa enzima, aparentemente pode ter diversos benefícios, além da defesa do organismo. Doenças com respostas hiperinflamatórias, onde aparece a inibição ou desregulação dessa enzima, podem ter sua resolução com substâncias que sejam eficazes na sua ativação (BEDARD; KRAUSE, 2007). De fato, o uso homeopático de *Belladonna* já vem sendo indicado em diversas doenças desse tipo, como artrite reumatóide. Esses resultados com espécies reativas mostram as diferentes ações com diferentes potências e a forma de administrá-las. O tratamento dos camundongos nos mostrou ainda a capacidade da Bell CH200 diminuir Ly-6G⁺ e aumentar CD45R⁺ na medula óssea. Essa alteração nos marcadores de células de origem mielóide e linfóide nos mostram que Bell CH200 pode atuar estimulando e recrutando esses dois tipos celulares, colaborando na defesa inata e adaptativa. A capacidade de Bell CH200

atuar em células B, macrófagos e neutrófilos nos mostra o poder de atuar nas frentes de defesa do organismo, com capacidade de eliminar rapidamente o agente agressor e ainda ativar a memória imunológica do organismo. A atividade efetora antimicrobial dos fagócitos é crucial na defesa inata do hospedeiro. Como resultado de uma origem comum macrófagos e neutrófilos compartilham diversas funcionalidades, incluindo ávida fagocitose, comportamentos chaves sob condições inflamatórias/infecciosas, e atividades antimicrobiais e imunomodulatórias. No entanto, devido a conseqüências da especialização durante suas diferenciação, macrófagos e neutrófilos adquirem distintas e complementares características que dão origem a diferentes níveis de capacidades antimicrobiais e citotoxicidade e diferentes localizações nos tecidos e tempo de vida. A combinação dessas características complementares e sobrepostas dos dois fagócitos promove sua cooperativa participação como efetores e moduladores da imunidade inata contra infecções e como orquestradores da imunidade adaptativa. Nas atividades antimicrobianas na imunidade inata, macrófagos e neutrófilos não são capazes de substituir um ao outro. O uso por mamíferos de um sistema com dois dedicados fagócitos trabalhando cooperativamente representa uma vantajosa estratégia de ataque, que permite eficiente e seguro uso de poderosas, mas perigosas moléculas de ataque (SILVA, 2010).

6.2.4 *Arsenicum album*

Arsenicum album é o medicamento preparado de forma homeopática a partir da tintura mãe do trióxido de arsênico. Em 2005, Oliveira mostrou que a potência CH6 do *Arsenicum album* aumentava o número de macrófagos com características de ativados quando comparado ao controle juntamente com a liberação da citocina INF- γ . De fato, desde o trabalho de Mackaness em 1970, sabe-se que as alterações na fisiologia dos macrófagos em resposta a alguns sinais ambientais podem provi-los de atividade antimicrobiana reforçada (MOSSER; EDWARDS, 2008). Assim, o primeiro passo para estudar o efeito do Ars CH6 sobre macrófagos foi a análise da liberação das espécies reativas.

Macrófagos peritoneais mostraram aumentar a liberação do NO após o tratamento com Ars CH6 *in vitro* (FIGURA 33A). Esse primeiro resultado sugere que Ars CH6 estaria atuando na via de produção desse radical, uma vez que a sua detecção no sobrenadante foi maior que no controle. iNOS, a enzima responsável pela produção do NO em macrófagos, é ativada por vários meios, como IFN- γ e LPS e uma vez ativa passa a produzir NO por varias horas, dias ou mais tempo. Esse NO produzido pode agir de inúmeras formas na célula e/ou no ambiente, que vão desde a defesa tóxica do organismo contra patógenos e células tumorais a sinalização celular (COLEMAN, 2001; KLIMP, *et al.*, 2002). Assim Ars CH6 possuiria uma provável ação sistêmica, via liberação de NO e IFN- γ , promovendo sinalização celular em direção a uma resposta imunológica inflamatória, levando em conta que essas duas moléculas são ativadoras de NF- κ B (FORMAN; TORRES, 2001). O processo de fagocitose/endocitose também ativa iNOS. De fato, no cultivo *in vitro* com posterior interação com leveduras, a quantidade de NO liberado foi maior em todos os grupos. No entanto, quando comparados os grupos com leveduras entre si, aqueles tratados com Ars CH6 mostraram uma diminuição significativa em relação ao controle (FIGURA 33B). Uma vez que a ativação da iNOS por fagocitose aumenta a produção desse radical para dentro da vesícula fagocítica com a finalidade de morte do patógeno, podemos considerar que o tratamento com Ars CH6 estaria modulando o poder de defesa e destruição dos macrófagos, através do estímulo de ações diretas e/ou indiretas do NO.

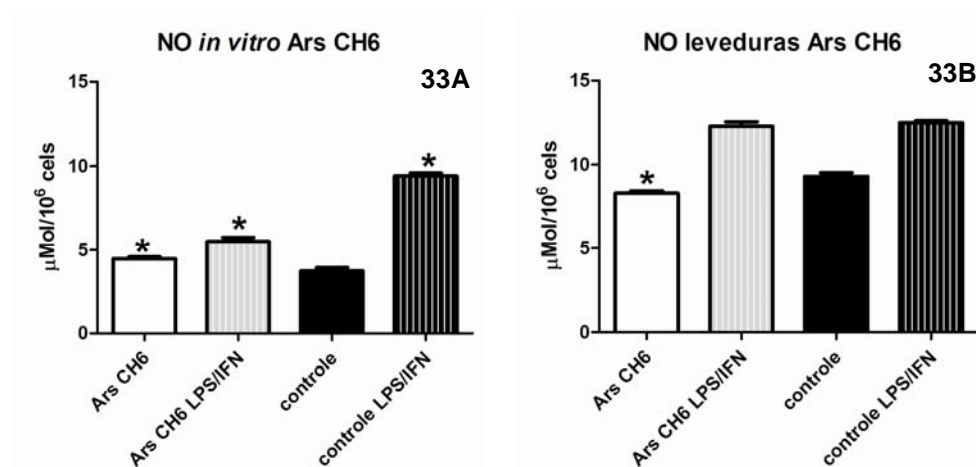
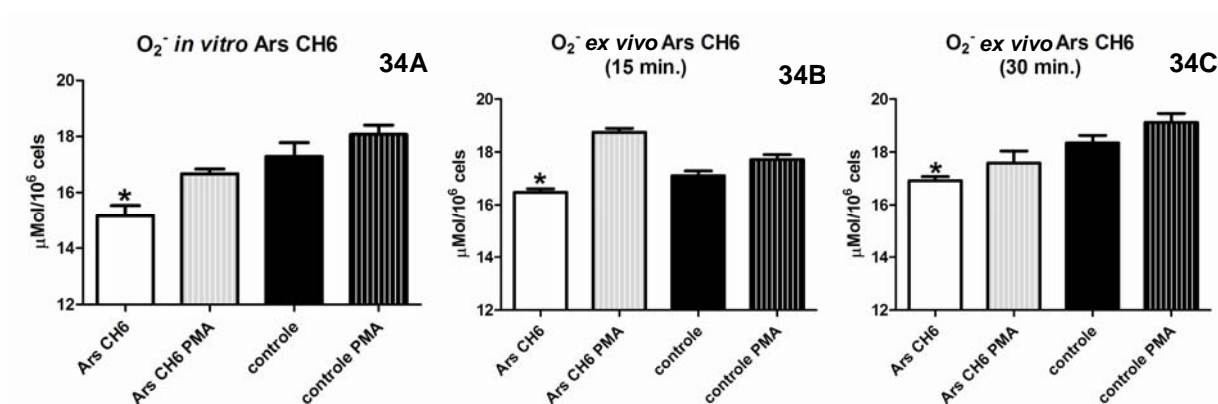


Gráfico 33A- (*) indicam grupos com aumento significativo na liberação de NO, quando comparado ao controle, após tratamento *in vitro* com Ars CH6 e cultivo por 72 horas ($P < 0.05$). Gráfico 33B - (*) indicam grupos com diminuição significativa na liberação de NO, quando comparado ao controle, após tratamento *in vitro* com Ars CH6, cultivo por 72 horas e posterior interação com leveduras ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como média ± erro padrão.

FIGURA 33 – LIBERAÇÃO DE NO POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO *IN VITRO* COM ARS

O NO por si só, é uma molécula com pouca reatividade química com moléculas orgânicas e preferencialmente liga-se a metais, mas em células que produzem ambos NO e O_2^- , ele pode atravessar a membrana em direção a fonte de O_2^- e juntos formarem $ONOO^-$ (FORMAN; TORRES, 2001) o qual é um potente mediador dos efeitos citotóxicos do NO (NATHAN; SHILOH, 2000) e também atuando em vias de sinalização (DENICOLA; RADI, 2005).

Após o tratamento com Ars CH6, os macrófagos diminuíram a liberação de O_2^- (FIGURA 34A). Como Ars CH6 também atuou na liberação de NO, pode-se sugerir uma provável ação desse medicamento no sistema imunológico via $ONOO^-$, produto resultante da junção desses dois radicais. Diminuição na liberação de O_2^- foi detectada também após o tratamento dos camundongos com Ars CH6 após os tempos de 15 e 30 min. de incubação (FIGURA 34B e 34C).



Gráficos mostrando a diminuição significativa na liberação de O_2^- quando comparado ao controle (*) após tratamento *in vitro* (34A) e *in vivo* após 15 e 30 min. de incubação (34B e 34C); ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 34 – LIBERAÇÃO DE O_2^- POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM ARS

Segundo LUNA, *et al.*, 2010, crianças expostas a Arsênico através da água de beber tiveram um aumento na liberação de O_2^- em monócitos sanguíneos. Assim, os nossos resultados podem colaborar com a sugestão de que diluições de Arsênico podem ser usadas como provável antagonista de envenenamentos por essa substância.

H_2O_2 também teve uma menor liberação nos grupos de camundongos tratados com Ars CH6, após o tempo de 30 min. de incubação (FIGURA 35). Uma vez que o H_2O_2 produzido na célula vem da dismutação de O_2^- , a diminuição de peróxido pode ser uma consequência da redução da sua fonte, induzida pelo Ars CH6.

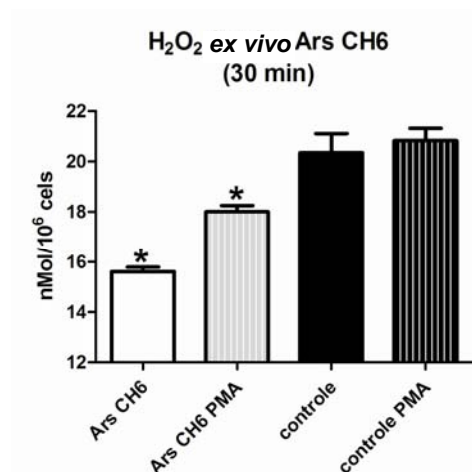
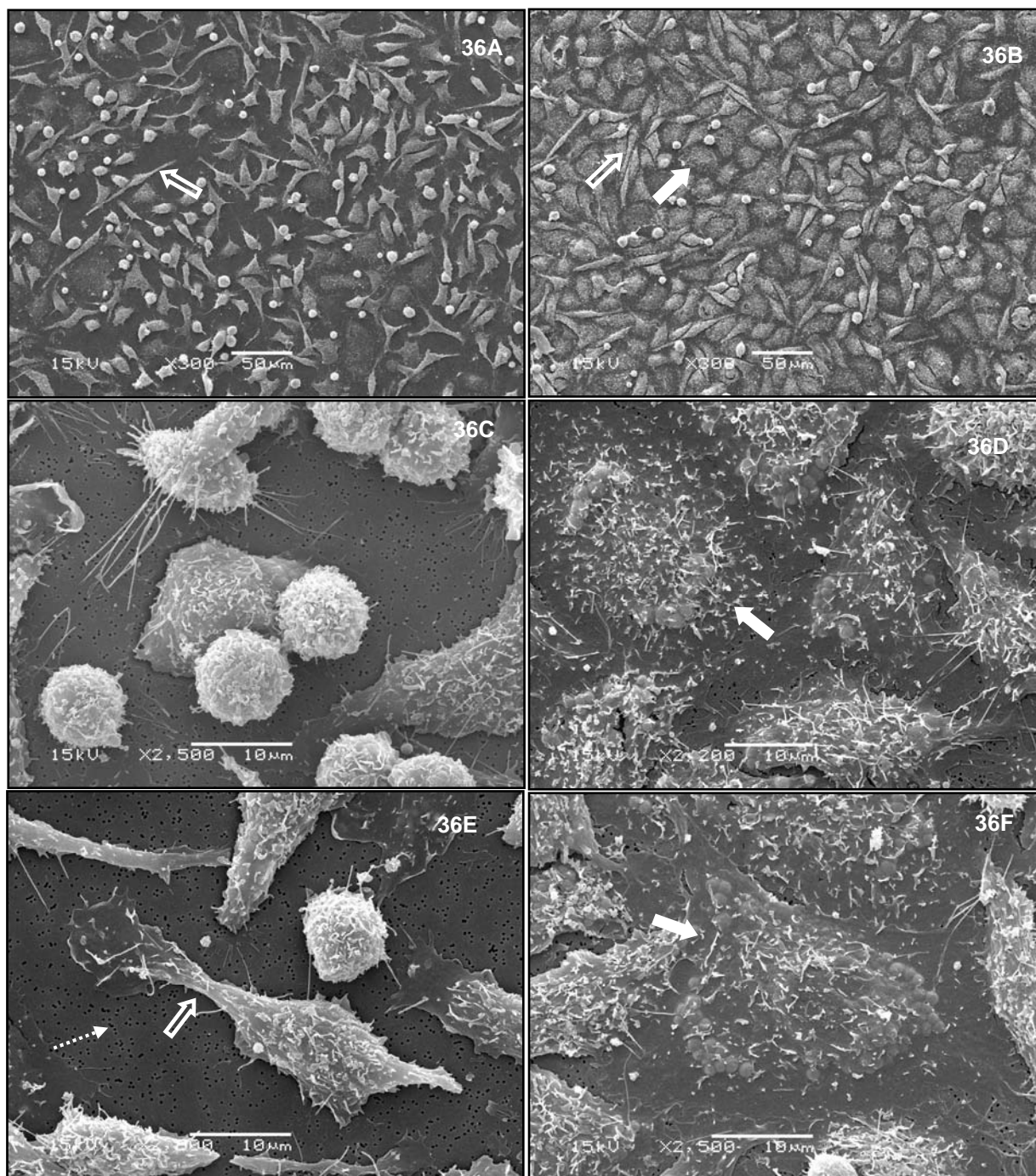


Gráfico mostrando a diminuição significativa na liberação de H₂O₂ quando comparado ao controle (*) após tratamento *in vivo* após 30 min. de incubação; ($P < 0.05$). Todos os resultados são espessos como média \pm erro padrão.

FIGURA 35 – LIBERAÇÃO DE H₂O₂ POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM ARS

MEV de macrófagos em co-cultura

Após 96 horas, a membrana da placa de co-cultura foi retirada e processada para MEV. Os macrófagos tratados com Ars CH6 mostraram uma morfologia de ativados, diferente do controle, os quais apresentaram morfologia de residentes (FIGURA 36). Macrófagos ativados mostram grandes projeções da membrana plasmática, aumento na capacidade de adesão e espalhamento no substrato, aumento da fagocitose, aumento no número de fagolisossomos e vesículas endocíticas e núcleo grande e eucromático (NORTH, 1978). De fato, tratamento *in vitro* por 48h com Ars CH6 ativou morfologicamente macrófagos (OLIVEIRA, 2005).

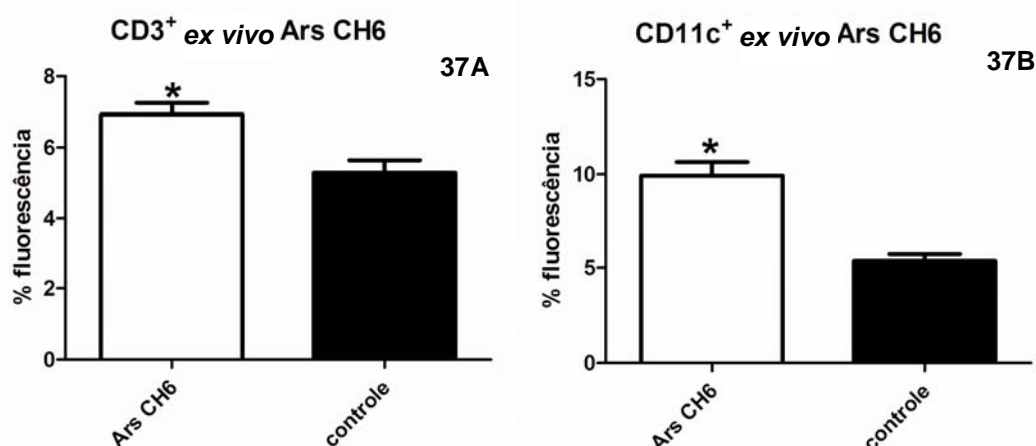


MEV de macrófagos co-cultivados com medula óssea por 96 horas. A, C e D - macrófagos controle, B, D e F - tratados com Ars CH6; Setas abertas = macrófagos residentes; macrófagos fechadas = macrófagos ativados; seta tracejada = poros da membrana

FIGURA 36 – MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM ARS EM CO-CULTURA

Imunofenotipagem das células da medula óssea

Após o tratamento dos camundongos com Ars CH6, as células da medula óssea do sobrenadante foram retiradas e imunomarcadas. Após a análise em citometria de fluxo, verificou-se que o tratamento com esse medicamento induziu um aumento na fluorescência dos marcadores CD3 ϵ e CD11c (FIGURA 37).



(*) aumentou significativamente em relação ao controle ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 37 – CD3 ϵ ⁺ E CD11c⁺ EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO *IN VIVO* COM ARS

O polipeptídeo CD3 ϵ , juntamente com o gama e beta e os heterodímeros do receptor de célula T (TCR), formam o complexo T-CD3, o qual é expresso sobre células T. O complexo tem um papel importante desde o reconhecimento do antígeno à transdução de várias vias de sinal intracelular. Agregação do receptor causa fosforilação de tirosinas com a cauda citoplasmática do complexo CD3 levando a ativação de genes seqüências e consequente proliferação da célula T. O polipeptídeo epsilon desempenha um papel essencial no desenvolvimento de células-T (DEJARNETTE *et al.*, 1998; PARKIN; COHEN, 2001).

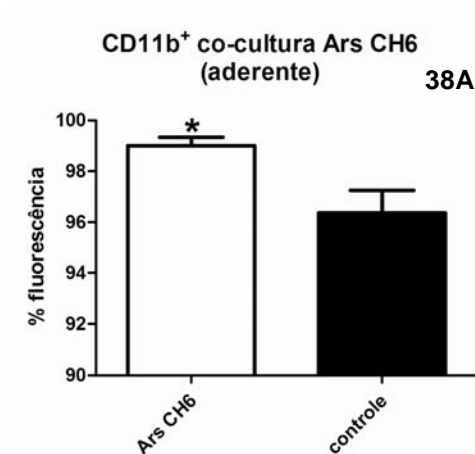
CD11c é a subunidade α do heterodímero $\alpha\chi\beta 2$ (CD18/CD11c) da integrina chamada p150,95 (HARRIS *et al.*, 2000). Nas CTHs, p150,95 não está presente nas unidades formadoras de granulócitos e monócitos, mas são as primeiras detectadas durante a diferenciação dessas células nos estágios mielocíticos e monoblásticos (ARNAOUT, 1990; GEORGAKOPOULOS *et al.*, 2008). Em células diferenciadas, essa integrina aparece em monócito, neutrófilos e é altamente expressa em linhagem de células dendríticas (ARNAOUT, 1990). Com esses resultados, pode-se

dizer Ars CH6 estimula a diferenciação e/ou proliferação das células T e de linhagem mielocítica, após induzir um aumento na expressão dos marcadores CD11c e CD3ε. Em Patterson *et al.* (2004), foi demonstrado que concentrações não tóxicas de arsênico induzem alterações nas populações celulares do sistema imunológico, resultando em mudanças funcionais.

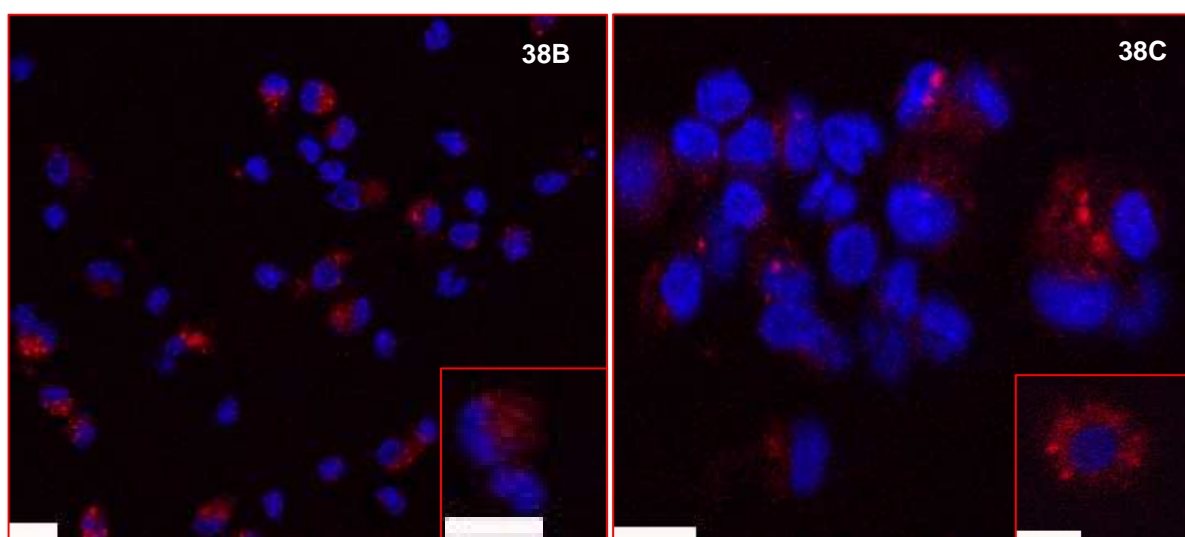
As células dendríticas, as principais células marcadas com CD11c, são importantes na iniciação e regulação da resposta imunológica contra uma variedade de antígenos, incluindo alérgenos, agentes infecciosos e tumores. Elas residem na maioria dos tecidos e são especializadas em capturar antígenos, migrar do tecido aos órgãos linfóides e estimular linfócitos T. São apresentadoras profissionais de antígeno, ou seja, são as únicas APCs capazes de estimular a primeira resposta imunológica. A primeira ativação de células T “naive” antígeno-específica depende de uma “conversa cruzada” com células dendríticas, envolvendo receptores TCR e MHCs, que induz a ativação, proliferação e diferenciação em células T efectoras antígeno-específicas (CLARK, *et al.*, 2000; STEINBRINK, *et al.*, 2009) Dessa forma, Ars CH6 alterando células T e células dendríticas, estaria atuando nos dois pontos chaves da resposta imunológica inata, adaptativa. Alguns estudos têm demonstrado que o crescimento tumoral causa expansão exagerada de células mielóides imaturas e consequentemente indiferenciação de células apresentadoras de antígeno, como células dendríticas, fica comprometida. A ausência das células capazes de ativar a célula T “naive” e a alta produção de espécies reativas inibem a proliferação de células T, causando uma imunossupressão no organismo. Uma vez que a produção dessas espécies reativas, especialmente H₂O₂ é inibida, as células mielóides conseguem terminar sua diferenciação (KUSMARTSEV; GABRILOVICH, 2003) Assim, pode-se sugerir que Ars CH6 seria útil no tratamento da imunossupressão causada pelo câncer, uma vez que além de estimular a diferenciação das células mais afetadas, diminui a liberação de espécies reativas.

CD11b⁺ em células de medula óssea

O tratamento *in vitro* das células da medula óssea com Ars CH6 não alterou a expressão do marcador CD11b . No entanto, o tratamento dos macrófagos em co-cultura com medula óssea, induziu um aumento na expressão desse marcador nas células aderentes da medula (FIGURA 38).



(*) aumentou significativamente em relação ao controle ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como $\text{media} \pm \text{erro padrão}$.



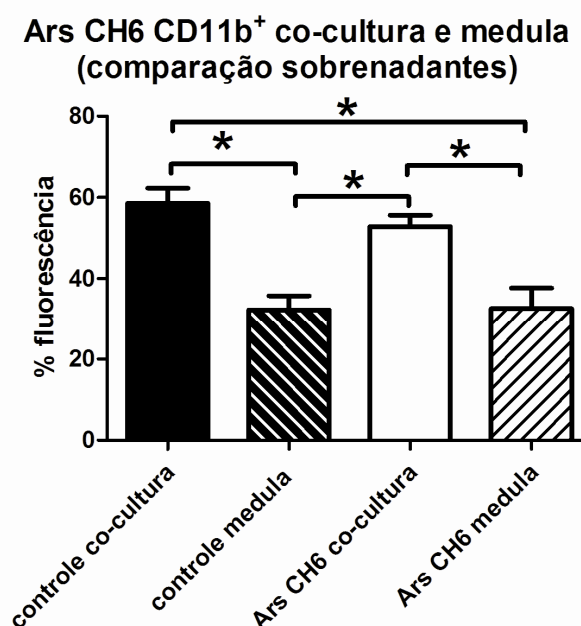
Cd11b com ficoeritrina (vermelho). Núcleo com DAPI (azul). Detecção em microscopia confocal. 38B-grupo controle; 38C – grupo tratado com Ars CH6. Aumento de 40X; Barra: 10 μm

FIGURA 38 - CD11b⁺ EM CÉLULAS ADERENTES DE MEDULA ÓSSEA APÓS CO-CULTURA COM MACRÓFAGOS E TRATAMENTO COM ARS

CD11b está evolutivamente relacionada aos receptores integrinas que medeiam adesão celular à matriz extracelular durante o desenvolvimento e reparo tecidual. (GEORGAKOPOULOS *et al.*, 2008). Nas CTHs não está presente nas unidades formadoras de granulócitos e monócitos, mas é um dos primeiros marcadores detectados durante a diferenciação de monócitos e granulócitos nos estágios mielocíticos e monoblásticos (ARNAOUT, 1990; KISHIMOTO *et al.*, 1990, YANG *et al.*, 2007). O aumento na expressão desse marcador nas células aderentes permite inferir que o tratamento com Ars CH6 induz adesão das células da linhagem mielocítica para provável diferenciação. As CTHs para se diferenciarem precisam estar aderidas ao estroma. Em cultura celular, depois de diferenciadas, algumas

células, como granulócitos e células dendríticas, se desprendem ficando no sobrenadante da cultura. Outras, como monócitos, ficam fortemente aderidas (INABA, *et al.*, 1992). Assim, Ars CH6 estaria promovendo uma diferenciação de toda linhagem mielocítica com ênfase em monócitos de uma forma dependente da presença de macrófagos.

Um dos maiores mecanismos que conferem malignidade as células é a alteração da adesão das células à matriz estromal. As células mielóides escapam da regulação negativa do estroma, se proliferando desreguladamente. Alguns agentes terapêuticos com IFN- α são usados para reverter o efeito da adesão, o qual está envolvido com a integrina $\beta 1$ (DEININGER, *et al.*, 2000). Compostos arsenicais têm sido usados para tratar vários tipos de leucemia. Trióxido de arsênico é efetivo em leucemia promielocítica aguda e é emergente no tratamento de mielomas múltiplos (ARONSON, 2006; LU, *et al.*, 2007). No entanto, diversos efeitos colaterais são encontrados, com pele extremamente seca, náuseas, dermatites, psoríases, neoplasias, leucocitoses, etc. (ARONSON, 2006). A leucemia mielóide crônica (LMC) é caracterizada pela medula robusta e produção de células mielóides extramedular. DEININGER, *et al.*, 2000 De acordo com a literatura e os nossos resultados, Ars CH6 pode ser um provável tratamento coadjuvante no tratamento de LMC, uma vez que atuou sobre os receptores CD11b e CD11c na medula óssea, tanto *ex vivo* quanto em co-cultura. Particularmente nessa técnica, mostrou aumentar a adesão destas células e conseqüente diferenciação, uma vez que a detecção do marcador CD11b foi maior nas células aderentes. A importância da adesão mediando inibição da proliferação fica claro quando se examina a malignidade das células-tronco hematopoiéticas, leucemia mielóide crônica. LMC é caracterizada por um defeito na adesão dos progenitores ao estroma da medula óssea e prematura liberação dos progenitores malignos para a circulação periférica (HURLEY *et al.*, 1995). A porcentagem na marcação do CD11b+ nas células não aderentes do sobrenadante da medula em co-cultura tratadas com Ars CH6, não tiveram diferenças significativas quando comparadas ao seu controle (dados não mostrados). No entanto, quando se compara as células não aderentes do tratamento *in vitro* da medula óssea com o sobrenadante da co-cultura, observa-se um maior quantidade de células CD11b⁺. Isso demonstra o fator dependente da presença dos macrófagos na alteração do marcador CD11b (FIGURA 39).



(*) aumentou significativamente ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como $\text{média} \pm \text{erro padrão}$.

FIGURA 39 – CD11b⁺ EM CÉLULAS NÃO ADERENTE EM CULTURA E CO-CULTURA.

Os resultados desse trabalho com Ars CH6 descrevem a sua ação sobre macrófagos peritoneais e células da medula óssea. A ativação dos macrófagos, demonstrada pelo aumento do NO, ativação morfológica (dados deste trabalho e de OLIVEIRA, 2005), de INF- γ (OLIVEIRA, 2005) juntamente com os dados da ação do Ars CH6 sobre as células da medula óssea (aumento de expressão de CD3, CD11c, CD11b nas células aderentes) e ainda informações da literatura, nos dão suporte para dizer que Ars CH6 pode ser promissor no tratamento de doenças malignas como mielomas. Corroborando com essa hipótese temos ainda a redução da liberação de espécies reativas, as quais em quantidade exarcebada, contribuem para a propagação das células tumorais (KUSMARTSEV; GABRILOVICH, 2003). Depois da terapia convencional, que consiste de quimioterapia, com ou sem transplante de células-tronco, doenças tanto reincidente como refratárias encurtam a sobrevivência de pacientes com leucemia mielóide aguda. Portanto, as opções de tratamento adicionais ou complementares são urgentemente necessárias, especialmente para combater células residuais (HÁJEK; BUTCH, 2000; YI, 2003; SMITS, *et al.*, 2009).

6.2.5 *Lachesis muta*

Evidências da atividade biológica de altas diluições do veneno da *Lachesis muta*, nas potências CH12 e 200, foram analisadas sobre macrófagos e células da medula óssea. A potência CH12 foi utilizada somente nos experimentos *in vitro* com macrófagos. Resultados prévios com estes medicamentos mostraram que Lach CH 12 e 200 ativam morfologicamente macrófagos (OLIVEIRA, 2005).

Liberação de NO, O_2^- e H_2O_2

Após tratamento *in vitro* com Lach, tanto CH12 quanto CH 200 aumentaram a liberação de NO no sobrenadante da cultura (FIGURA 40A e B, respectivamente). O mesmo efeito pode ser também observado após o tratamento dos camundongos com Lach CH200 (FIGURA 40C.) sugerindo assim, uma provável estimulação das funções efectoras dos macrófagos por Lach. De fato, NORTH, em 1978, mostrou que morfologia celular varia consideravelmente com diferentes estados funcionais. Quando os macrófagos passam do estado residente para o estado ativado, eles aumentam a sua proliferação, modificam sua morfologia celular, adquirem propriedade de se espalhar, aumentam a fagocitose e a produção de espécies reativas, como o NO. Em uma ativação clássica, a transcrição da iNOS induzida por IFN- γ , estimula a produção de NO na célula, de uma maneira autócrina e parácrina (GESSANI; BELARDELLI, 1998). Neste caso, esta pode ser a via usada por Lach para estimular a liberação de NO, uma vez que OLIVEIRA, 2005 mostrou que Lach CH200 aumentou a liberação de IFN- γ em macrófagos tratados *in vitro*. O NO possui várias ações, como potenciais antivirais, antitumorais e antimicrobial (WEIGER; BRÜNE, 2008; PALUDAN, *et al.*, 1999). Assim, resolvemos analisar o efeito da liberação desta espécie após estimular o sistema de defesa fagocítico, usando leveduras. Após o cultivo *in vitro* dos macrófagos por 48 horas e posterior interação com as leveduras, Lach CH 200 diminuiu a liberação de NO quando comparado ao seu controle com levedura (FIGURA 40D). Lach CH12 não alterou a liberação após a interação.

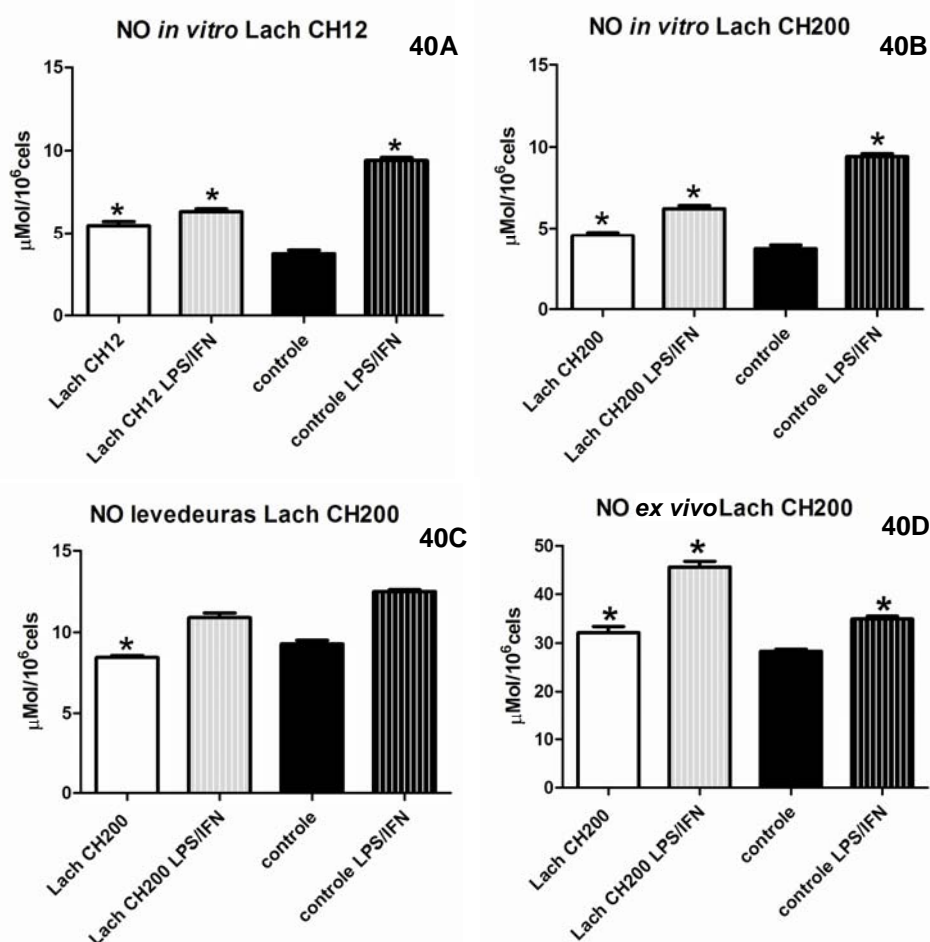


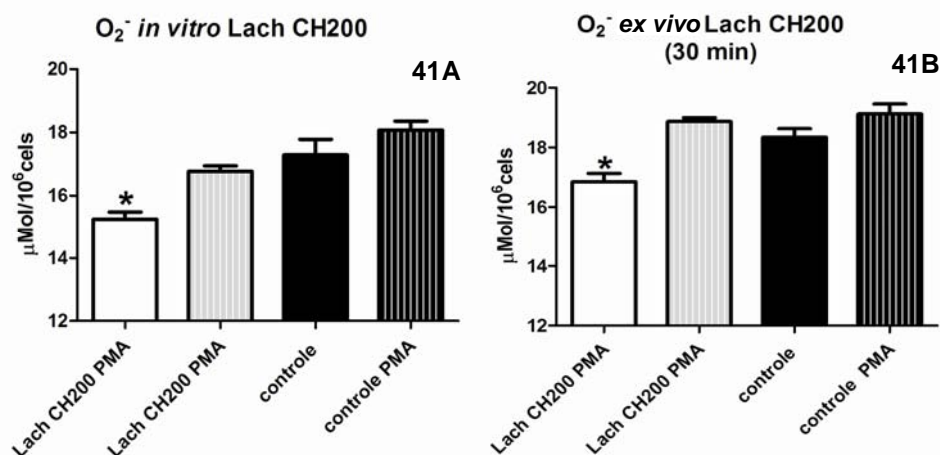
Gráfico 40A, 40B e 40D - (*) indicam grupos com aumento significativo na liberação de NO, quando comparado ao controle, após tratamento *in vitro* com Lach CH 12 e 200 (A e B, respectivamente) e *in vivo* com Lach CH200 (D). Gráfico C- (*) indica diminuição significativa na liberação de NO, quando comparado ao controle, após tratamento *in vitro* com Lach CH 200 e posterior interação com leveduras. ($P < 0.05$); Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 40 – LIBERAÇÃO DE NO POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO *IN VITRO* COM LACH

Quando acontece a fagocitose, a enzima iNOS desvia a produção de NO para dentro dos fagossomos para destruição do microorganismo. De fato, quando comparamos os grupos sem leveduras e com leveduras, podemos notar que há uma maior liberação de NO quando macrófago interage com o fungo. No entanto, quando os macrófagos são tratados com Lach CH200, há um provável direcionamento dessa produção para dentro dos fagossomos, de forma que a maior concentração de NO contribua para uma defesa mais eficaz da célula.

Após os tratamentos dos camundongos e dos macrófagos com Lach CH200 pode-se quantificar uma alteração da liberação de O_2^- pelos macrófagos. Quando O_2^- é produzido e liberado da célula, o método mais confiável para sua mensuração

é o da redução do citocromo c (FORMAN; TORRES, 2001). Após essa análise, Lach CH12 não mostrou alteração na liberação desses radicais (dados não mostrados). No entanto, Lach CH200 diminuiu O_2^- após ser administrado aos camundongos e tratamento *in vitro* dos macrófagos (FIGURA 41).

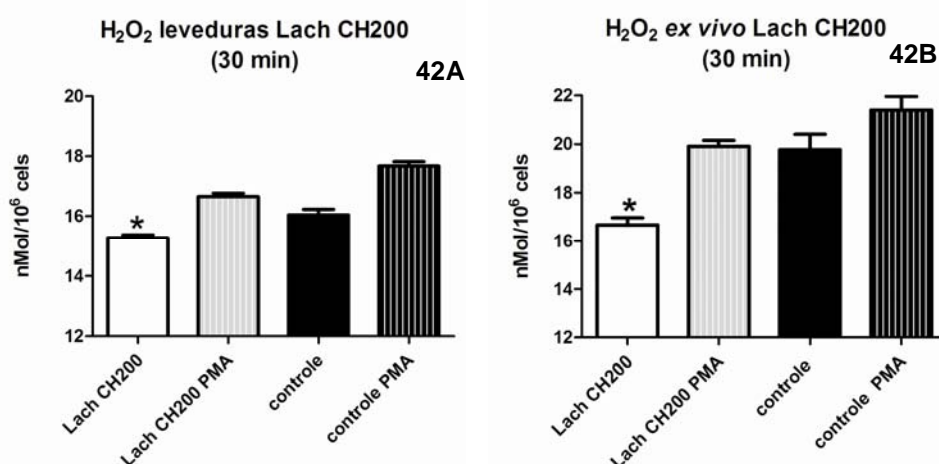


Gráficos mostrando a diminuição significativa na liberação de O_2^- quando comparado ao controle após tratamento *in vitro* (41A) e *in vivo* após 30 min. de incubação (41B) (*) ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 41 – LIBERAÇÃO DE O_2^- POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM LACH

A superóxido desmutase (SOD) é conhecida como o sistema protetor antioxidante celular mais potente contra os efeitos do O_2^- . Entretanto, sabe-se que sob condições onde a produção de NO está aumentada, o NO compete eficientemente com a SOD pelo O_2^- , formando o $ONOO^-$ (VIRAG *et al.*, 2003). Como NO é uma pequena molécula, ela pode atravessar a membrana de vesículas, migrando para perto da fonte de O_2^- (JONES *et al.*, 2000). A proximidade desses dois radicais faz com que aconteça uma reação controlada entre NO e O_2^- , produzindo intermediários, como peroxinitrito ($ONOO^-$) (WEIGER; BRÜNE, 2008). Como Lach CH 200 aumentou a liberação de NO e diminuiu a liberação de O_2^- após os tratamentos, podemos sugerir Lach estaria ativando os mecanismos de produção $ONOO^-$ dentro de vesículas dos macrófagos. A formação de $ONOO^-$ a partir de O_2^- e NO deve ser útil em algumas situações. Além da destruição de patógenos, $ONOO^-$ também pode atuar, em algumas circunstâncias, como uma defesa anti-oxidante por prevenir um aumento na concentração de O_2^- and H_2O_2 (MURPHY, *et al.*, 1998, SZABÓ, 2003, LINARES, *et al.*, 2001), e de prevenir um provável efeito inibitório da proliferação de células T pelo NO (VAN DER VEEN, 2001).

No sistema celular o O_2^- é convertido a H_2O_2 espontaneamente ou pela ação da superóxido desmutase (SOD) (PICK; KEISARI, 1980). Portanto, estudos sobre o efeito de Lach sobre esse radical também foram realizados. Lach CH12 e 200 não mostraram possuir efeito sobre a liberação de H_2O_2 , após o tratamento *in vitro* (dados não mostrados), no entanto, Lach CH200 induziu diminuição na sua liberação quando o macrófago interage com leveduras (FIGURA 42A). Após tratamento dos camundongos dos camundongos com Lach CH200, esse mesmo efeito de redução da liberação foi observado (FIGURA 42B)



Gráficos mostrando a diminuição significativa na liberação de H_2O_2 quando comparado ao controle após tratamento *in vitro* com posterior interação com leveduras (42A) e *in vivo* (42B) ambos após 30 min. de incubação. (*) ($P < 0.05$); Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 42 – LIBERAÇÃO DE H_2O_2 POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM LACH

Após a interação macrófagos/leveduras, a liberação de NO e H_2O_2 pelos macrófagos diminuíram significativamente. No entanto, quando comparados os grupos com leveduras e sem leveduras, a liberação de NO foi maior do que naqueles sem leveduras. De fato, a interação da levedura com o receptor de manose (MR) pode estar envolvido na indução da síntese de NO (GRUDEN-MOVSESIJAN; MILOSAVLJEVIC, 2006). Lach, então, diminuindo a liberação desses radicais, provavelmente aumentando a capacidade de geração de ONOO⁻ dentro das vesículas, aumentando o poder de destruição dos microorganismos. E conseqüentemente, a diminuição na liberação de H_2O_2 , contribui para um efeito citoprotetor no momento em que a células está com sua produção mais alta de espécies reativas. Esta defesa anti-oxidante, por prevenir um aumento na

concentração de H_2O_2 , pode ser verificado pela diminuição da liberação de H_2O_2 em análise *ex vivo*, uma vez que a sua produção depende de O_2^- livre no meio, o qual provavelmente foi usado na reação com NO. De fato, a injúria causada por ROS liberado por macrófagos e neutrófilos ativados, tem um importante papel na etiologia de várias doenças, como desordens neurodegenerativas, cancer, doenças cardiovascular, aterosclerose, cataratas, diabetes, inflamação (ARUOMA, 1998; KRIS-ETHERTON *et al.*, 2004). Nestes casos, drogas potentes e administração a longo prazo são necessárias para o tratamento dessas doenças crônicas. No entanto, essas drogas têm vários e graves efeitos colaterais. Dessa forma, agentes com pouco ou nenhum efeito colateral são requeridos para substituir as quimioterapias. Nesse contexto, Lach parece funcionar como um provável anti-oxidante, pois diminui a produção de ROS em condições normais da célula e após fagocitose. Um esquema sumarizando os efeitos de Lach sobre a liberação de ROS esta demonstrado nas figuras 43 e 44.

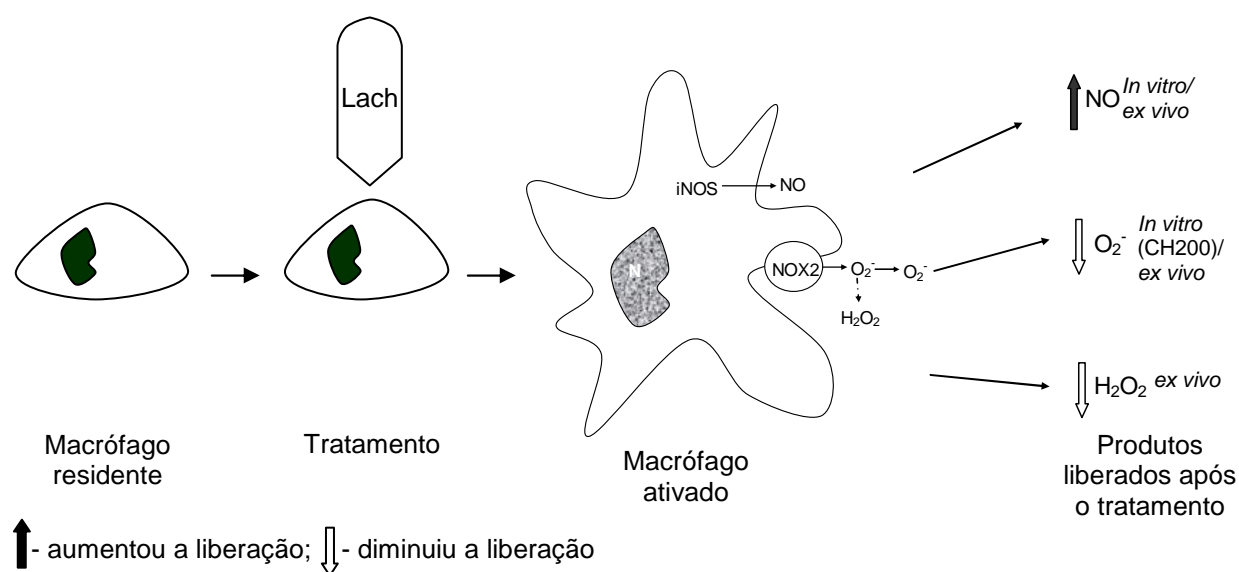


FIGURA 43 –EFEITOS DO TRATAMENTO *IN VITRO* E *IN VIVO* COM LACH

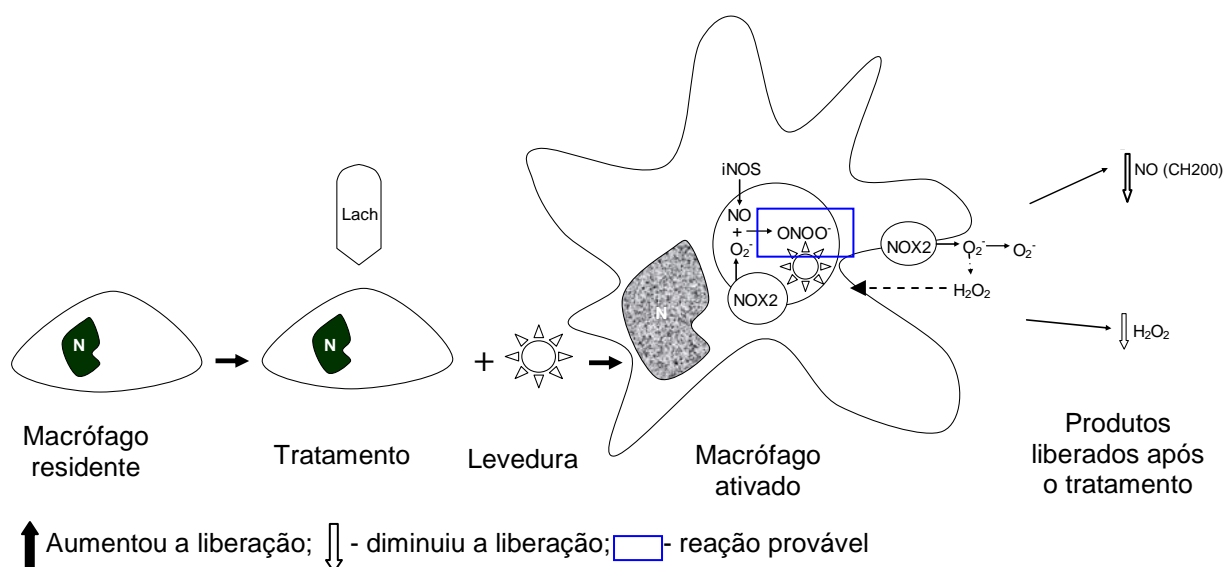
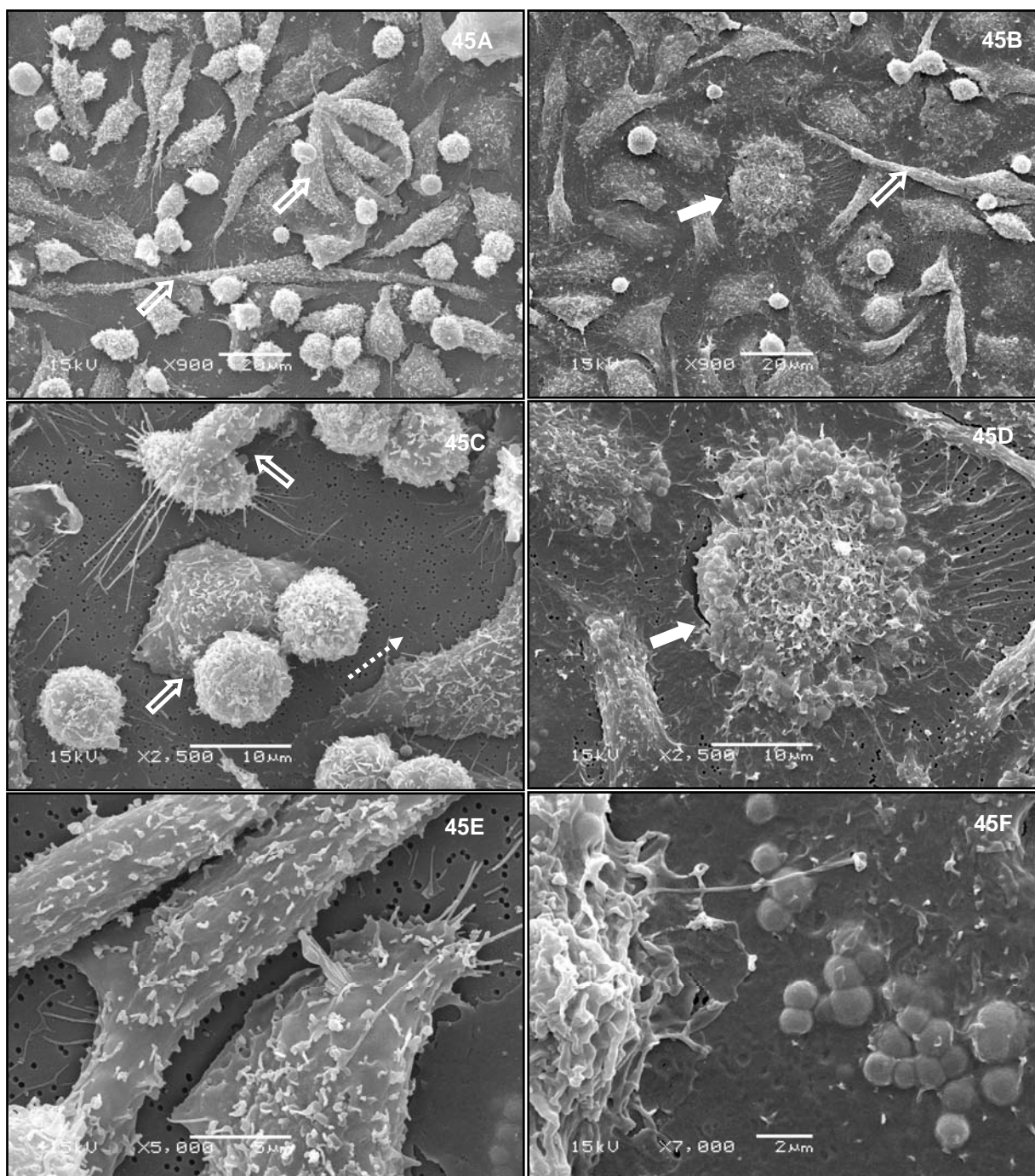


FIGURA 44 –EFEITOS DO TRATAMENTO *IN VITRO* COM LACH E POSTERIOR INTERAÇÃO COM LEVEDURAS

MEV de macrófagos em co-cultura

Após 96 horas, a membrana da placa de co-cultura foi retirada e processada para MEV. Os macrófagos tratados com Lach mostraram morfologia de ativado, diferente do controle, o qual apresentou morfologia de residente (FIGURA 45). Macrófagos ativados mostram grandes projeções da membrana plasmática, aumento na capacidade de adesão e espalhamento no substrato, aumento da fagocitose, aumento no número de fagolisossomos e vesículas endocíticas e núcleo grande e eucromático (NORTH, 1978). De fato, tratamento *in vitro* por 48h com Lach ativou morfologicamente os macrófagos (OLIVEIRA, 2005).

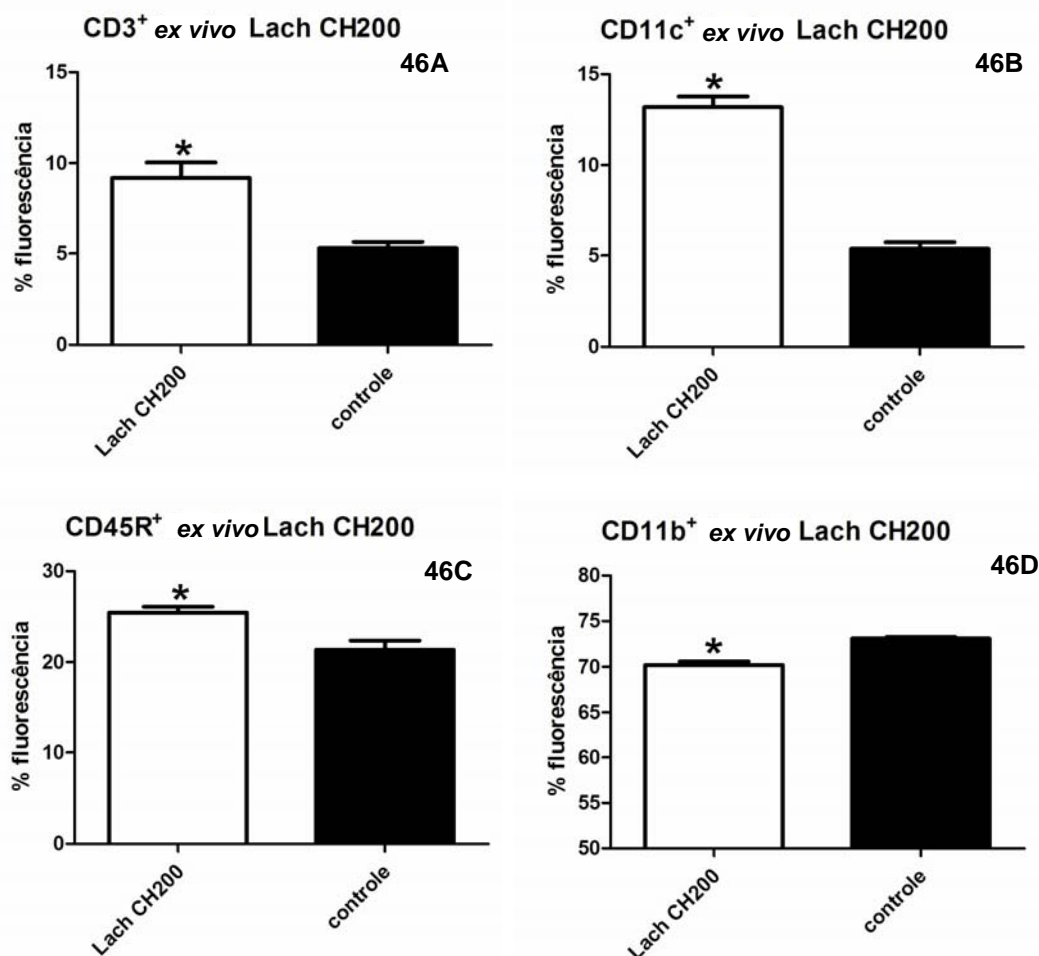


MEV de macrófagos co-cultivados com medula óssea por 96 horas. A , C e E - macrófagos controle, B, D e F - tratados com Lach CH200. Setas abertas = macrófagos residentes; setas fechadas = macrófagos ativados; seta tracejada = poros da membrana

FIGURA 45 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM LACH CH200 EM CO-CULTURA

Imunofenotipagem das células da medula óssea

Após tratamento dos camundongos com Lach CH200, as células da medula óssea foram marcadas com anticorpos contra a linhagem hematopoiética e analisadas em citometria de fluxo. Esta técnica mostrou que o tratamento aumentou a expressão dos marcadores CD3 ϵ , CD11c e CD45R e diminuiu CD11b (FIGURA 46).



Gráficos 46A, 46B e 46C (*) indicam grupos com aumento significativo e Gráfico D (*) indica grupo com diminuição significativa em relação ao controle ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 46 – CD3 ϵ ⁺, CD11c⁺, CD45R⁺ E CD11b⁺ EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO *IN VIVO* COM LACH

O CD3 ϵ pode ser detectado desde precursores da linhagem de células T na medula óssea até ser altamente expresso em células T maduras (KLEIN, *et al.*, 2003). Faz parte do complexo CD3, o qual é um formado por 4 polipeptídeos (CD3 ϵ , γ , δ , ζ). CD3 ϵ tem um papel fundamental no desenvolvimento inicial de células T e é

essencial para a expressão e função do pre-TCR e TCR (DEJARNETTE *et al.*, 1998; DAVE, 2009). O efeito de Lach CH200 sobre esse marcador pode indicar um efeito de diferenciação sobre as células T.

As integrinas Mac-1 e p150,95 são glicoproteínas heterodiméricas ($\alpha\beta$). As subunidades α , distintas nessas duas integrinas, foram designadas como CD11b em Mac-1 e CD11c em p150,95. A subunidade β homóloga é chamada de CD18 (KISHIMOTO *et al.*, 1990; HARRIS *et al.*, 2000). Ambas integrinas são expressas em monócitos, macrófagos, células dendríticas, polimorfonucleares e células Natural Killers. O que varia é a quantidade relativa dessas integrinas conforme o tipo de célula e seu estado de ativação ou diferenciação (ARNAOUT, 1990; GEORGAKOPOULOS *et al.*, 2008). Nas CTHs, CD11b/CD18 e CD11c/CD18 não estão presentes nas unidades formadoras de granulócitos e monócitos, mas são as primeiras detectadas durante a diferenciação de monócitos e granulócitos nos estágios mielocíticos e monoblásticos (ARNAOUT, 1990; KISHIMOTO *et al.*, 1990, YANG *et al.*, 2007). Com esses resultados, pode-se dizer que Lach CH200 administrada aos camundongos atua na diferenciação de precursores da linhagem mielóide, com ênfase em células dendríticas e monócitos. As principais células CD11c⁺ são células dendríticas. São importantes na iniciação e regulação da resposta imunológica contra uma variedade de antígenos, incluindo alérgenos, agentes infecciosos e tumores. Elas residem na maioria dos tecidos e são especializadas em capturar antígenos, migrar do tecido aos órgãos linfóides e estimular linfócitos T. São apresentadoras de antígeno profissional, ou seja, são as únicas APCs capazes de estimular a primeira resposta imunológica. A primeira ativação de células T “naive” antígeno-específica depende de uma “conversa cruzada” com células dendríticas que induz a ativação, proliferação e diferenciação em células T efetoras antígeno-específicas (CLARK, *et al.*, 2000; STEINBRINK, *et al.*, 2009). O principal alvo marcador do CD11b são monócitos/macrófagos. Sob condições inflamatórias, a produção de monócitos na medula óssea é aumentada e depois liberada na circulação sanguínea. Macrófagos são rapidamente recrutados ao sítio da lesão e infecção onde eles diferenciam-se em macrófagos inflamatórios (VAN FURTH *et al.*, 1973) Os resultados da imunofenotipagem demonstraram que o tratamento diminuiu a detecção das células marcadas com CD11b em células da

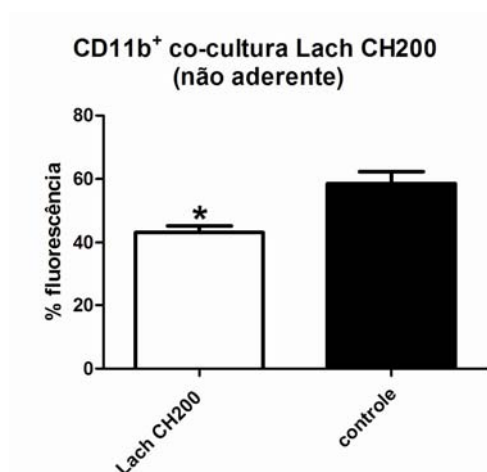
medula óssea. Com esses resultados pode-se sugerir que Lach CH200 estaria recrutando monócitos aos locais de defesa.

A imunofenotipagem da medula óssea revelou que o tratamento com Lach CH200 aumentou significativamente o marcador CD45R. CD45R (B220) é uma das formas com alto peso molecular de uma série de glicoproteínas transmembranas conhecidas como CD45, a qual é expressa em todas as células linfóides. No entanto, CD45R é a primeira molécula específica de células B expressa durante a diferenciação. É atribuída como molécula marcadora de centro de germinação de células B e continua sendo expressa (em menor quantidade) até a célula B madura e ativada. (COFFMAN, 1982; HASEGAWA *et al.*, 1990; MONROE; DORSHKIND, 2007). Estimulando a expressão desse marcador, Lach CH200 pode estar contribuindo para a diferenciação das células B e consequente estímulo da resposta imunológica adaptativa e melhorar os elementos do sistema inato (PARKIN; COHEN, 2001).

Se Lach CH200 atuar sobre a produção de IFN- γ por macrófagos após tratamento dos camundongos, assim como foi demonstrado por Oliveira (2005) após tratamento *in vitro*, é provável que essa ação sobre as células precursoras seja por intermédio dessa citocina. Tem sido demonstrado que IFN- γ induz diferenciação de células mielocíticas e monocíticas da medula óssea, ativa células T em direção a uma resposta imunológica tipo Th1 (GESSANI; BELLARDELI, 1998) e ativam o linfócito B, com produção de imunoglobulinas e sua secreção (JANEWAY *et al.*, 2007). Assim, a ação de Lach CH200 sobre as células na medula óssea, seria de uma maneira dependente de macrófagos.

CD11b⁺ em células de medula óssea

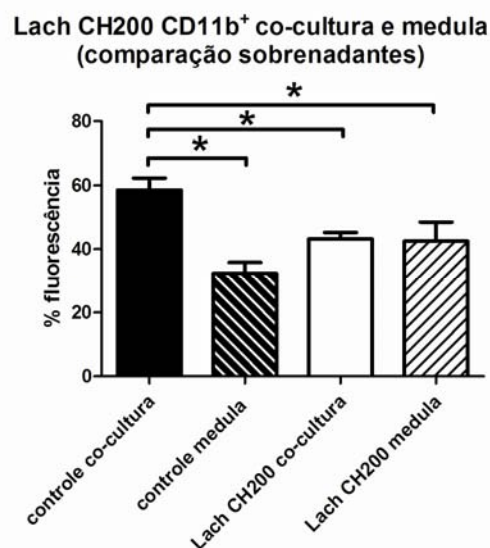
Após 96 horas, as células não aderentes do cultivo de medula óssea e as células aderentes e não aderentes da medula óssea co-cultivadas com macrófagos peritoneais foram incubadas com anticorpo contra CD11b. A análise em citometria de fluxo mostrou que o tratamento diminuiu o marcador CD11b no sobrenadante da medula em co-cultura (FIGURA 47) mas não alterou significativamente esse marcador nas células aderentes da co-cultura e não aderentes da medula cultivada sozinha (dados não mostrados)



(*) diminuiu significativamente em relação ao controle ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como $\text{media} \pm \text{erro padrão}$

FIGURA 47 – CD11b⁺ EM CÉLULAS NÃO ADERENTES DE MEDULA ÓSSEA APÓS CO-CULTURA COM MACRÓFAGOS E TRATAMENTO COM LACH

CD11b esta evolutivamente relacionada ao receptor integrina que medeia adesão celular à matriz extracelular durante o desenvolvimento e reparo tecidual (GEORGAKOPOULOS *et al.*, 2008). Nas CTHs é um dos primeiros marcadores detectados durante a diferenciação de monócitos e granulócitos nos estágios mielocíticos e monoblásticos (ARNAOUT, 1990; KISHIMOTO *et al.*, 1990, YANG *et al.*, 2007). As CTHs para se diferenciarem precisam estar aderidas ao estroma, diferentemente da proliferação (INABA, *et al.*, 1992). Uma vez que o tratamento das células da medula óssea com Lach CH200 diminuiu a porcentagem de células CD11b⁺ não aderentes em co-cultura é provável que o medicamento esteja inibindo a proliferação destas células. Quando se compara os controles dos cultivos de células de medula óssea sozinha e co-cultivadas com macrófagos, pode-se notar um número significativamente maior de células CD11b⁺ não aderentes na medula co-cultivada (FIGURA 48).

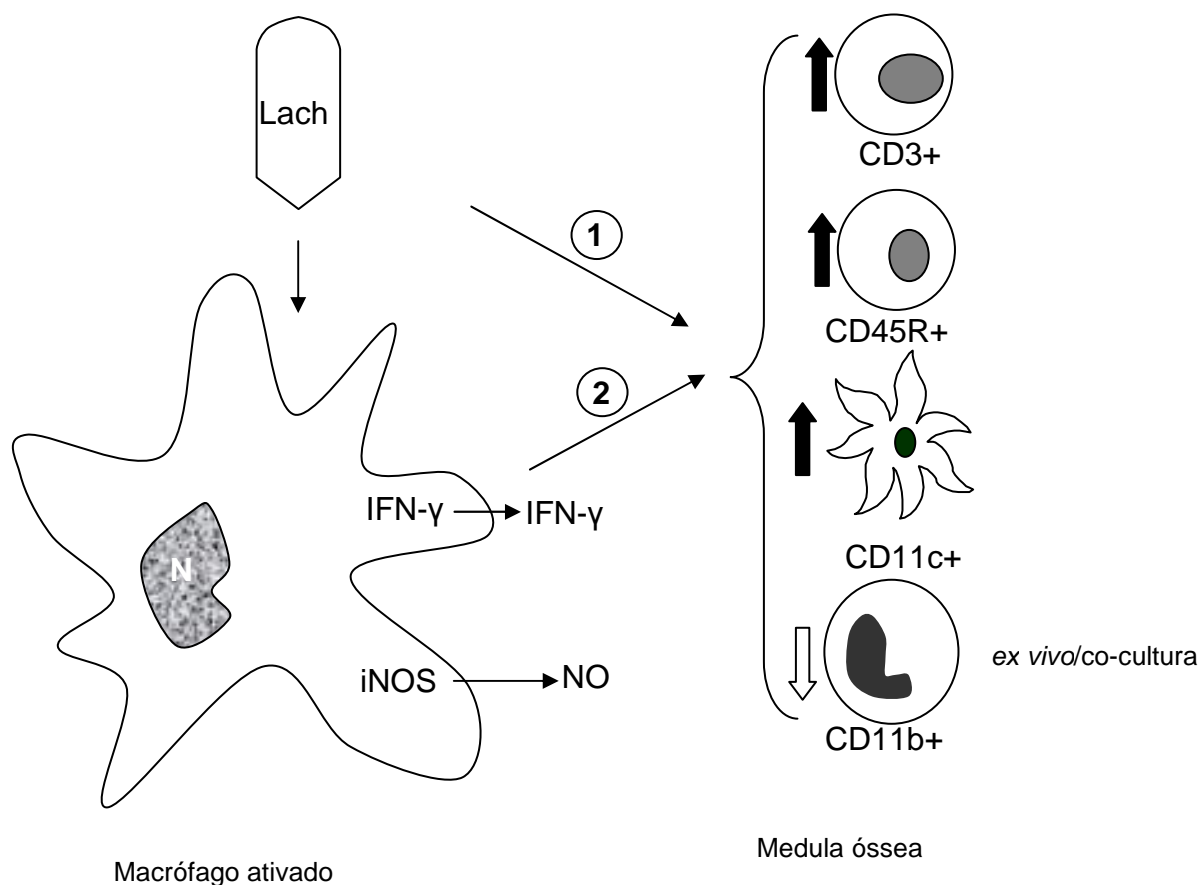


(*) aumentou significativamente ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 48 – CD11b⁺ DE CÉLULAS NÃO ADERENTES EM CULTURA E CO-CULTURA.

Assim, pode-se dizer que a presença de macrófagos, por si só, possui efeito proliferativo sobre as células da medula. No entanto, quando é adicionado Lach CH200, a porcentagem de células CD11b⁺ não aderentes da co-cultura diminui, aproximando-se daquela encontrada no cultivo de medula óssea sozinha. Frente a esses resultados, pode-se sugerir que o tratamento com Lach CH200 inibe o efeito proliferativo dos macrófagos sobre as células não aderentes.

Os resultados da imunofenotipagem após tratamento dos camundongos e estes resultados *in vitro* indicam que Lach CH200 estimula a proliferação celular e/ou diferenciação em medula óssea de camundongos de uma forma dependente ou não de macrófagos. Um esquema mostrando os efeitos do tratamento com Lach CH200 foi sumarizado na figura 49



Neste esquema apresentamos duas teorias para a ação do medicamento nas células da medula óssea. (1) Lach CH200 pode ter ação direta sobre estas células. (2) Lach ativa macrófagos que produzem substâncias as quais possuem efeito sobre essas células precursoras.

FIGURA 49 – EFEITOS DE LACH NOS MARCADORES HEMATOPOIÉTICOS DAS CÉLULAS DA MEDULA APÓS TRATAMENTO *IN VIVO* E CO-CULTURA

Neste trabalho, avaliamos os efeitos do veneno de *Lachesis muta* preparado forma homeopática, nas potências CH12 (*in vitro*) e 200 (*ex vivo*). Os tratamentos com Lach mostrou ativar macrófagos peritoneais estimulando a liberação de NO. Estes resultados juntamente com a liberação de IFN-γ (OLIVEIRA, 2005) podem caracterizar macrófagos tratados com Lach como macrófago inflamatório. Macrófagos têm um papel chave na imunidade por ajudar a iniciar a imediata resposta inata à infecção, por mobilizar linfócitos e elaborar resposta humoral, a qual fornece uma proteção sustentada contra patógenos intra e extracelulares (MURTAUGH; FOSS, 2002). Dessa forma, Lach poderia estar, via ativação de macrófagos alterando as células da medula óssea. De fato, em condições

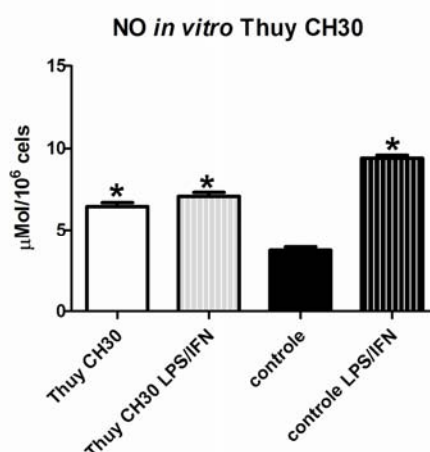
inflamatórias, ocorre um aumento significativo da produção de células CD11b⁺, que são rapidamente recrutados ao local da inflamação, onde se diferenciam em macrófagos inflamatórios. Esses macrófagos, por sua vez, secretam substâncias que estimulam a diferenciação de outros precursores da linhagem monocítica e sua conseqüente liberação na corrente sanguínea (GESSANI; BELARDELI, 1998; VAN FURTH *et al.*, 1973). Além desse recrutamento, macrófagos possuem a função de estimular a diferenciação e proliferação de outras células do sistema imunológico, como células T e B e células dendríticas (GESSANI; BELARDELI, 1998; GORDON; TAYLOR, 2005; JANEWAY *et al.*, 2007). Efeito dessa provável ação dos macrófagos foi observado após o tratamento dos camundongos com Lach CH200. Desta maneira, Lach CH200 parece estimular precursores de praticamente todas as células de defesa, dependente ou não de macrófagos, além de controlar a proliferação de células CD11b⁺ de medula óssea, quando essas são co-cultivadas com macrófagos. Efeito de moderador do Lach foi observado na produção de ROS por macrófagos. O tratamento com esse medicamento diminui a liberação de O₂⁻ e H₂O₂, e quando há um aumento da produção desses ROS para a defesa celular, como no caso da interação do macrófago com leveduras, há um provável desvio desse acréscimo de radicais para dentro dos fagossomos. Esta ação protege a célula de um estresse oxidativo e colabora para uma destruição eficaz do invasor. Assim, Lach parece funcionar como um provável antioxidante, pois protege a célula de um excesso de ROS, e atua em praticamente em todas as células do sistema imunológico. Provavelmente via ativação e especialização de macrófagos inflamatórios. De fato, como dito anteriormente, na homeopatia esse medicamento é utilizado em processos inflamatórios e a sua extensa patogênese pode ser devido a sua ação em diversas células do sistema imunológico.

6.2.6 *Thuya occidentalis*

Em trabalho anterior, OLIVEIRA, 2005, mostrou que o tratamento *in vitro* com *Thuya occidentalis* na potência CH30 aumentou o número de macrófagos peritoneais com o estado morfológico de ativado. Ao passar do estado residente para ativado, além de mudanças na morfologia celular, macrófagos adquirem propriedades como habilidade de se espalhar, fagocitose e produção de espécies reativas como (NO) (NORTH, 1978).

Liberação de NO, O_2^- e H_2O_2

Neste trabalho, verificou-se que, de fato, os macrófagos ativados pelo tratamento com Thuy CH30 *in vitro* aumentaram significativamente a liberação de NO no sobrenadante da cultura (FIGURA 50).

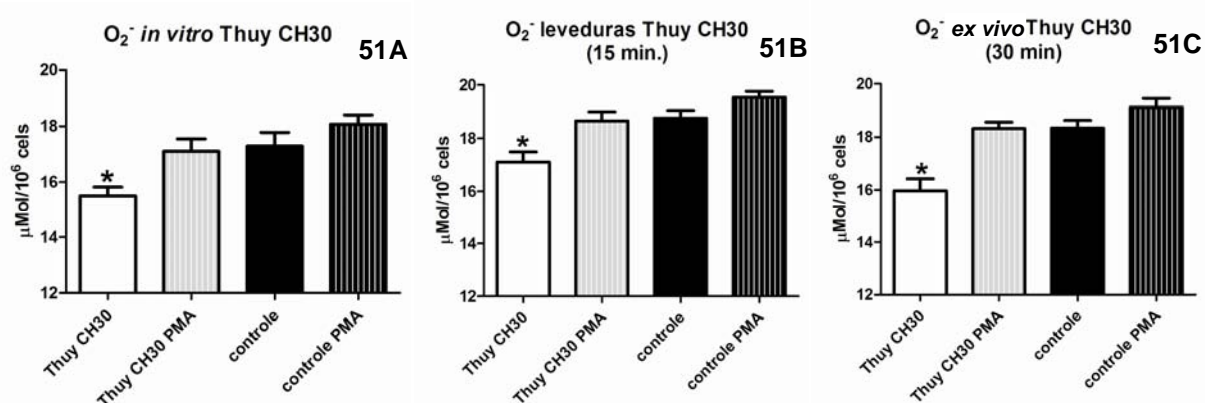


(*) indicam grupos com aumento significativo na liberação de NO, quando comparado ao controle, após tratamento *in vitro* com Thuy CH30 e cultivo por 72 horas ($P < 0.05$); Todos os resultados são expressos como média ± erro padrão.

FIGURA 50 – LIBERAÇÃO DE NO POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO *IN VITRO* COM THUY

Em macrófagos ativados, a iNOs, enzima responsável pela produção de NO, pode ser ativada por vários estímulos e está envolvida na defesa do hospedeiro. NO é a molécula efetora responsável pela citotoxicidade de macrófago (CADENAS; CADENAS, 2002; PALUDAN *et al*, 1999). Resultado semelhante sobre a ação de *Thuya occidentalis* foi descrito por NASER; SHILOH, 2005, o qual relatou que macrófagos alveolares cultivados *in vitro* e incubados com extrato de *Thuya* por 48 horas, aumentou a produção de NO_2^- (resultado da reação de NO com O_2). O NO

liberado por macrófagos deve também ativar o fator nuclear de transcrição NF- κ B, o qual a ativação é essencial para a expressão de um grande número de citocina e genes de adesão que são mediadores críticos para reação inflamatória (BRUCKDORF, 2005; COLEMAN, 2001; FORMAN; TORRES, 2001). Dessa forma, Thuy CH30 pode estar ativando macrófagos *in vitro* para uma via de defesa classificada como inflamatória. Thuy CH30 não alterou a liberação de NO após os tratamentos *in vitro* de macrófagos com posterior interação com levedura e análise *ex vivo* (dados não mostrados). Após a ativação dos macrófagos por Thuy CH30, foi detectada uma diminuição na liberação de ânion superóxido em todos os tratamentos realizados (FIGURA 51).



Gráficos mostrando a diminuição significativa na liberação de O_2^- quando comparado ao controle após tratamento *in vitro* (51A) *in vitro* com posterior interação com leveduras (15 min. de incubação) (51B), ambos por 48 horas e *in vivo* (30 min. de incubação) (51C) (*) ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 51 – LIBERAÇÃO DE O_2^- POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM THUY

Esses resultados sugerem que esse medicamento diminui a produção desse radical, contribuindo para prevenir um estresse oxidativo. Quando se comparam os experimentos com e sem leveduras, verifica-se um aumento significativo na liberação desse radical no experimento com leveduras em todos os grupos. Ainda assim, o tratamento com Thuy CH30 diminui a liberação de O_2^- após a interação dos macrófagos com leveduras quando comparado ao controle (sem tratamento e com levedura). Em células fagocíticas ativadas a grande fonte de O_2^- provém do complexo enzimático NOX. Após ser estimulada, NOX2, a subunidade catalítica da NOX, pode produzir ROS intra (dentro dos fagossomos) e extracelularmente (CROSS; SEGAL, 2004; BROWN; GRIENDLING, 2009). Assim, pode-se sugerir, que apesar do aumento significativo da liberação de superóxido após a fagocitose, o

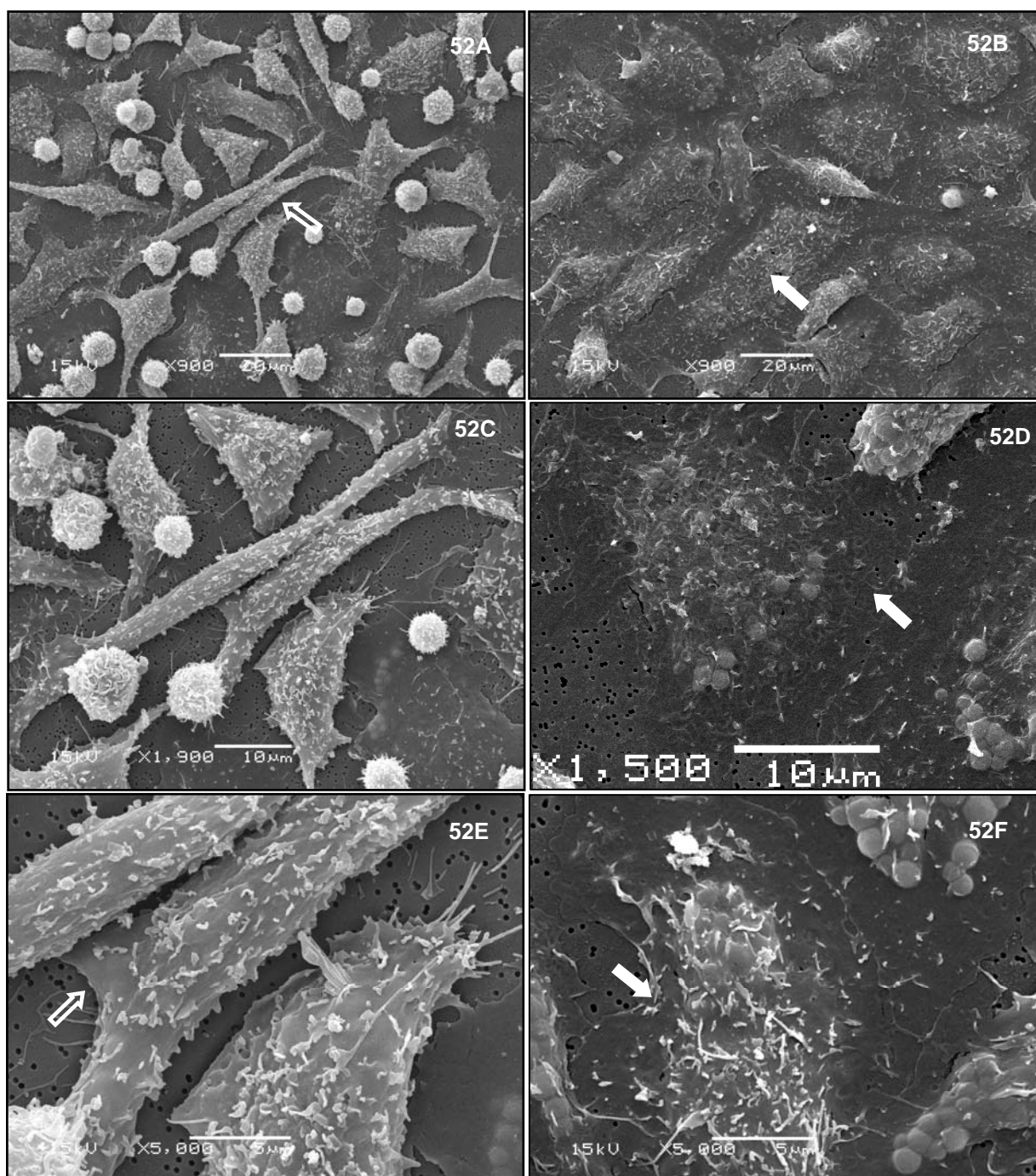
tratamento com Thuy CH30, direciona uma maior quantidade para dentro dos fagossomos para provável destruição dos microorganismos, e, consequentemente diminui a liberação desse radical no sobrenadante. Assim, mesmo numa ocasião de aumento na produção do O_2^- , Thuy CH30 preveniria o organismo de um aumento na concentração de radical. Atividades antioxidantes de *Thuya occidentalis* vêm sendo demonstrada pelo grupo de DUBEY; BATRA, (2008, 2009a, 2009b). Seus trabalhos mostram que o extrato etanólico de *Thuya occidentalis* diminui ou previne o aumento dos radicais livres, como ânion superóxido, inclusive por interferir na ação e/ou quantidade de enzimas antioxidantes. Estes efeitos têm por consequência a melhora de quadros e prevenção de doenças, como diabetes e doenças cardíacas.

A análise da liberação de H_2O_2 após o tratamento com a Thuy não mostrou nenhuma alteração significativa em nenhum dos estudos (dados não mostrados). Para tanto, podemos sugerir 2 hipóteses: 1- o H_2O_2 gerado e liberado nesse caso, não provém do O_2^- alterado na célula com o tratamento; 2- caso a diminuição do superóxido seja causado por um aumento na dismutação desse para H_2O_2 , enzimas que quebram esse radical, como peroxidases, podem estar ativas com o tratamento de Thuy CH30. Assim, podemos novamente sugerir que a potência CH30 de *Thuya occidentalis* possui efeitos semelhantes ao seu extrato, reduzindo ou prevenindo o aumento de radicais. Experimentos verificando a ação dessas enzimas após o tratamento seriam necessários para corroborar essa hipótese. Macrófagos são os maiores produtores de espécies reativas em uma resposta imunológica inflamatória, e uma modulação na liberação desses radicais pode ser muito importante para a manutenção e resolução de diversas doenças. De fato, a injúria causada por ROS liberado por macrófagos e neutrófilos ativados, tem um importante papel na etiologia de várias doenças, como desordens neurodegenerativas, câncer, doenças cardiovascular, arteriosclerose, cataratas, diabetes, inflamação (ARUOMA, 1998; KRIS-ETHERTON *et al.*, 2004).

MEV de macrófagos em co-cultura

Após 96 horas, a membrana da placa de co-cultura foi retirada e processada para MEV. Os macrófagos tratados com Thuy CH30 mostraram morfologia de ativados, diferente do controle, o qual apresentou morfologia de residente (FIGURA 52). Resultado equivalente foi demonstrado por Oliveira, (2005), onde o tratamento *in vitro* por 48h com Thuy CH 30 aumentou o número de macrófagos ativados.

Macrófagos ativados mostram grandes projeções da membrana plasmática, aumento na capacidade de adesão e espalhamento no substrato, aumento da fagocitose, aumento no número de fagolisossomos e vesículas endocíticas e núcleo grande e eucromático (NORTH, 1978).

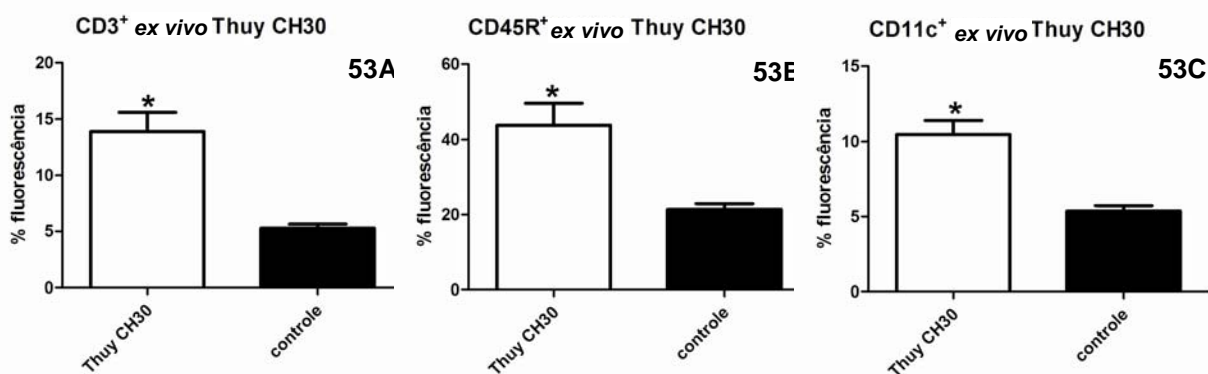


MEV de macrófagos co-cultivados com medula óssea por 96 horas. A, C e E - macrófagos controle, B, D e F - tratados com Thuy CH30. Setas abertas = macrófagos residentes; setas fechadas = macrófagos ativados

FIGURA 52— MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM THUY EM CO-CULTURA

Imunofenotipagem das células da medula óssea

Após tratamento dos camundongos com Thuy CH30 as células da medula óssea foram extraídas e processadas para imunofenotipagem. A análise em citometria de fluxo mostrou que o tratamento induziu um aumento na expressão dos marcadores CD3 ϵ , CD45R e CD11c (FIGURA 53).



(*) aumentou significativamente em relação ao controle ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 53 – CD3 ϵ ⁺, CD45R⁺, E CD11c⁺ EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO *IN VIVO* COM THUY

O polipeptídeo CD3 ϵ , juntamente com o gama e beta e os heterodímeros do receptor de célula T (TCR), forma o complexo T-CD3. O polipeptídeo epsilon desempenha um papel essencial no desenvolvimento de células-T. Defeitos neste gene causam imunodeficiência. (DEJARNETTE, *et al.*, 1998; PARKIN; COHEN, 2001). O efeito de Thuy CH30 sobre esse marcador pode indicar um efeito proliferativo sobre as células T, como foi descrito por Naser *et al.* (2005). Neste trabalho, extrato etanólico de *Thuya occidentalis* mostrou estimular a proliferação e diferenciação de células T helper e aumentar a produção de INF- γ dessas células, de uma maneira dependente da presença de monócitos/macrófagos. Estímulo sobre a produção dessa citocina também foi observado em Oliveira (2005), a qual demonstrou um aumento na detecção de INF- γ após o tratamento de macrófagos com Thuy CH30. Assim, é possível que Thuy CH30 esteja estimulando a proliferação e diferenciação de células T na medula óssea, por meio da ativação de macrófagos, pois segundo revisado em Gessani; Belardeli (1998) INF- γ produzido por

macrófagos pode estimular e ativar linfócitos T em direção a uma resposta imunológica Th1 e recrutar células do sistema imunológico ao local de defesa.

A imunofenotipagem da medula óssea revelou que o tratamento com Thuy CH 30 aumenta significativamente o marcador CD45R. CD45R (B220) é uma das formas com alto peso molecular de uma série de glicoproteínas transmembranas conhecidas como CD45, a qual é expressa em todas as células linfóides. No entanto, CD45R é a primeira molécula específica de células B expressa durante a diferenciação. É atribuída como molécula marcadora de centro de germinação de células B e continua sendo expressa (em menor quantidade) até a célula B madura e ativada. (COFFMAN, 1982; HASEGAWA *et al.*, 1990; MONROE; DORSHKIND 2007). Estimulando a expressão desse marcador, Thuy CH30 pode estar contribuindo para a diferenciação das células B e consequente estímulo da resposta imunológica adaptativa. Células B diferenciadas produzem anticorpos. Estes servem para neutralizar toxinas, prevenir organismos de aderir à superfície de mucosa, ativar complemento, opsonizar bactérias para fagocitose e sensibilizar tumor e células infectadas e citotoxicidade dependente de anticorpo por células Killer. Assim, o anticorpo atua para melhorar os elementos do sistema inato (PARKIN; COHEN, 2001). NASER *et al.* em 2005 descreveu que polissacarídeos da *Thuya occidentalis* possuem efeito estimulante sobre a produção de anticorpos.

O aumento da detecção do marcador CD11c nas células da medula óssea após o tratamento dos camundongos, pode significar que Thuy CH30 esteja estimulando a diferenciação e/ou proliferação das células mielóides. CD11c é a subunidade α do heterodímero $\alpha\chi\beta 2$ (CD18/CD11c) da integrina chamada p150,95 (HARRIS *et al.*, 2000). É um receptor multifuncional e esta diretamente envolvida na adesão e migração celular. Essa integrina aparece em monócito/ macrófagos, neutrófilos e é altamente expressa em células dendríticas. (ARNAOUT, 1990). Nas CTHs são as primeiras detectadas durante a diferenciação de monócitos e granulócitos nos estágios mielocíticos e monoblásticos (ARNAOUT, 1990; GEORGAKOPOULOS *et al.*, 2008). Na defesa imunológico, os antígenos devem ser processados por APCs (macrófagos, células dendríticas e células B) e apresentados para células T antígeno-específicas para desencadear uma resposta imunológica. Entre as APCs, as células dendríticas ativadas são as mais potentes estimuladoras de células T “naive” (PARKIN; COHEN, 2001). As células dendríticas são células

consideradas adjuvantes naturais para a imunoterapia em doenças malignas. São extremamente potentes no estímulo de células T, as quais são ideais para respostas anti-melanoma. Vários estudos têm demonstrado que a proteína do mieloma, também chamada idiotipo (Id), é suficientemente imunogênico para gerar respostas das células T em pacientes com mieloma, com capacidade de estimular células dendríticas para serem usadas na imunoterapia, no tratamento de neoplasias diversas, incluindo mieloma múltiplo, uma doença maligna de células B. As estratégias de imunoterapia são estratégias para a citorredução adicionais as quimioterapias necessárias para a cura (HÁJEK; BUTCH, 2000; YI, 2003). As técnicas desenvolvidas para desenvolver e estimular células dendríticas são demoradas e caras (SMITS, *et al.*, 2009) Assim, um medicamento que pudesse ativar as células dendríticas no próprio organismo, poderia ser uma alternativa eficaz e mais viável para o tratamento de doenças como o câncer. Frente a isso, os resultados obtidos após o medicamento Thuy CH30 ser administrado aos camundongos, parece ser promissor, pois além de estimular a diferenciação das células da linhagem B, estimula a linhagem de células dendríticas e células T, fatores principais para o reconhecimento da célula tumoral e sua destruição.

O tratamento dos camundongos com Thuy CH30 mostrou que esse medicamento atua nas células de medula óssea aumentando os marcadores das células precursoras de praticamente todo o sistema imunológico. Dessa maneira, pode-se dizer que Thuy CH30 possui efeito nas respostas imunológicas inata e adaptativa.

CD11b⁺ em células de medula óssea

O tratamento *in vitro* da medula óssea com Thuy CH30 não alterou a marcação de células CD11b⁺. No entanto, após co-cultivar essas células com macrófagos peritoneais, ocorreu um aumento na marcação de células CD11b⁺ aderentes da medula (FIGURAS 54A e 55) e uma diminuição na marcação das células não aderentes (FIGURAS 54B).

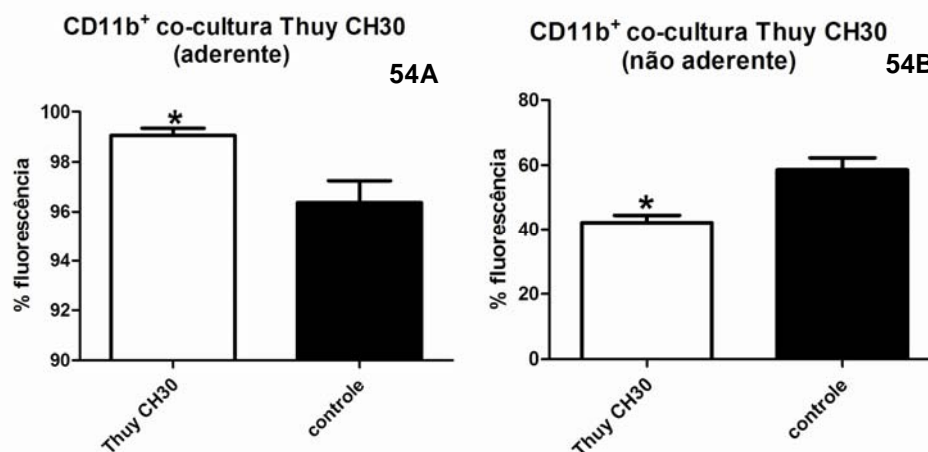
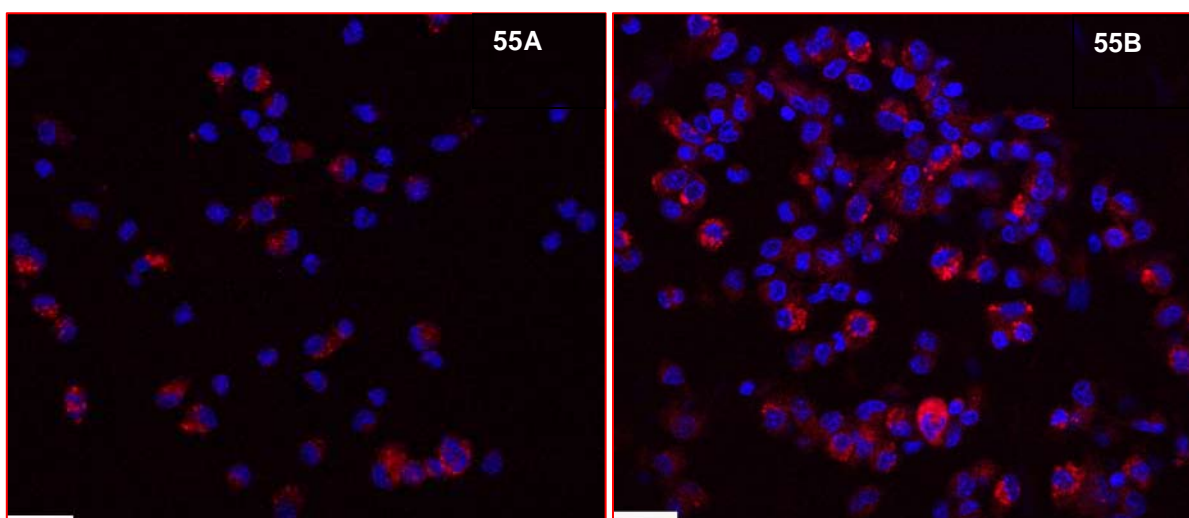


Gráfico 54A - (*) aumentou significativamente em relação ao controle ($P < 0.05$). Gráfico 54B - (*) diminuiu significativamente em relação ao controle. Todos os resultados são expressos como $\text{média} \pm \text{erro padrão}$.

FIGURA 54 – CD11b⁺ EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS CO-CULTURA COM MACRÓFAGOS TRATADOS COM THUY



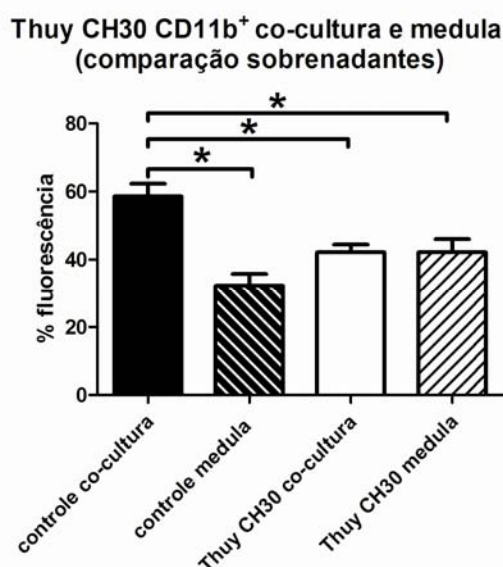
Cd11b com ficoeritrina (vermelho). Núcleo com DAPI (azul). Detecção em microscopia confocal. A- grupo controle; B – grupo tratado com Thuy CH30. Barra: 20 μm ; Aumento: 40X

FIGURA 55 – CD11b⁺ EM CÉLULAS ADERENTES DE MEDULA ÓSSEA APÓS CO-CULTURA COM MACRÓFAGOS TRATADOS COM THUY

Nas CTHs, Mac-1 (CD11b/CD18) não está presente nas unidades formadoras de granulócitos e monócitos, mas são as primeiras detectadas durante a diferenciação de monócitos e granulócitos nos estágios mielocíticos e monoblásticos (ARNAOUT, 1990; KISHIMOTO *et al.*, 1990, YANG *et al.*, 2007). O aumento na expressão desse marcador nas células aderentes pode inferir que o tratamento com Thuy CH30 induz uma adesão das células da linhagem mielocítica para provável diferenciação. As CTHs para se diferenciarem precisam estar aderidas ao estroma. Em cultura celular,

depois de diferenciadas, algumas células, como granulócitos e células dendríticas, se desprendem ficando no sobrenadante da cultura. Outras, como monócitos, ficam fortemente aderidas (INABA, *et al.*, 1992). Assim, Thuy CH30 estaria promovendo uma diferenciação de toda linhagem mielocítica com ênfase em monócitos de uma forma dependente da presença de macrófagos. De fato, Thuy CH30 induz produção de IFN- γ em macrófagos peritoneais após tratamento *in vitro* (OLIVEIRA, 2005). Essa citocina possui ação sobre células mielomonocíticas, induzindo diferenciação de monócitos em células de medula óssea (GESSANI; BELARDELI, 1998).

Quando se compara as marcações do cultivo da medula óssea com a co-cultura, pode-se verificar que o controle da medula em co-cultura mostra um aumento significativo na marcação CD11b⁺ quando se compara ao controle da medula *in vitro*, demonstrando provável efeito proliferativo dos macrófagos. No entanto, após o tratamento com Thuy CH30 observa-se uma diminuição das células marcadas com CD11b⁺ no sobrenadante da co-cultura (FIGURA 56).



(*) aumentou significativamente ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como $\text{media} \pm \text{erro padrão}$.

FIGURA 56 – CD11b⁺ DE CÉLULAS NÃO ADERENTE EM CULTURA E CO-CULTURA.

Esta ocorrência pode significar uma indução da diferenciação das células CD11b⁺, uma vez que esse fenômeno é dependente de adesão celular, o que pode ser observado no aumento das células CD11b⁺ aderentes.

Thuy CH30, medicamento originado da tintura mãe de macerados de *Thuya occidentalis*, demonstrou possui diversos efeitos sobre as células do sistema imunológico, de forma semelhante à ação do extrato alcoólico dessa planta. Os resultados das investigações *in vitro* e *ex vivo* indicam um potencial imunomodulador de Thuya CH30. O principal alvo dos componentes imunologicamente ativo parece ser a de macrófagos / monócitos, assim também como foi revisado por Nasser, 2005 com polissacarídeos da *Thuya occidentalis*. De fato, macrófagos participam na produção, mobilização, ativação e regulação de vários tipos celulares do organismo (ex: fibroblastos, células endoteliais, etc.) e de todas as células efetoras do sistema imunológico. Eles interagem reciprocamente com outras células enquanto suas propriedades são modificadas para realizar funções imunológicas especializadas (GORDON, 1999).

Thuy CH30, demonstrou neste trabalho, assim como em OLIVEIRA (2005) ativar morfologicamente macrófagos peritoneais de camundongo. Como descrito na literatura, verificou-se que macrófagos ativados aumentam a liberação de NO. Como efeito desse aumento, Thuy CH30 pode ativar as defesas do organismo e sinalização de respostas imunológicas inflamatórias. A ação de sobre as funções de defesa do macrófago pode ser constatada também com a análise da liberação do radical O_2^- após a interação com leveduras. Enquanto ocorre um aumento na liberação desse radical por ocasião da fagocitose, Thuy CH30 provavelmente desvia a produção desse radical para dentro dos fagossomos, pois a quantidade de O_2^- liberado é menor no sobrenadante desse grupo do que no controle com leveduras.. Esse direcionamento do radical, além de contribuir para um aumento na eficácia de destruição do patógeno, contribui para a proteção do organismo contra um burst oxidativo. Essa proteção também pode ser constatada com a diminuição desse radical após os tratamentos e na prevenção do aumento de H_2O_2 pela provável dismutação de O_2^- . Além da ação sobre células diferenciadas, Thuy CH30 mostra também atuar sobre as precursoras não só de macrófagos mas como de praticamente todas as células do sistema imunológico, como linfócitos T, B, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Um aumento na detecção dos marcadores CD3ε, CD45R e CD11c, pode significar uma ação em todo o sistema imunológico, influenciando as respostas imunológicas inata e adaptativa. Essa ação sistêmica, no entanto, pode ser dependente da presença de macrófagos. Células de

medula óssea tratadas *in vitro* com Thuy CH30 não mostrou diferenças significativas na expressão de marcadores CD11b, mas quando co-cultivadas com macrófagos as células tanto aderentes quanto não aderentes mostraram alteração nessa marcação positiva, sugerindo provável efeito sobre a diferenciação da linhagem mielocítica. Assim, Thuy CH 30 aparece como um medicamento imunoestimulador, provavelmente dependente de macrófago e apesar de diversos efeitos serem semelhantes ao do extrato da planta, o uso desse medicamento seria vantajoso em relação ao extrato e polissacarídeos da *Thuya occidentalis* por não apresentar o efeito tóxico da planta.

6.2.7 *Bryonia alba*

Neste trabalho, foi utilizada a *Bryonia alba* na potência CH200 somente nos tratamentos dos camundongos, *in vitro* de medula óssea e co-cultura. A análise de espécies reativas pode ajudar a analisar o efeito de determinadas substâncias sobre a atividade de diversas células do sistema imunológico, principalmente naquelas que participam de respostas inflamatórias, como macrófagos. Assim, após tratamento dos camundongos com Bry CH200 foram analisados a liberação de NO, O_2^- e H_2O_2 liberados por essas células

Liberação de NO, O_2^- e H_2O_2

Após o tratamento dos camundongos, verificou-se que Bry CH200 diminuiu significativamente a detecção de O_2^- no sobrenadante quando comparada ao controle (FIGURA 57) e aumentou a detecção de H_2O_2 , (FIGURA 58) ambos após o tempo de 15 min. de incubação.

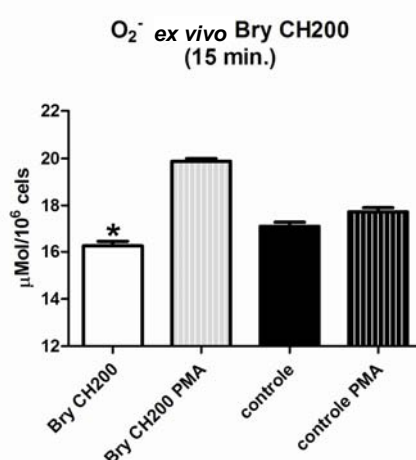


Gráfico mostrando a diminuição significativa na liberação de O_2^- (15 min. de incubação), quando comparado ao controle após tratamento *in vivo* (*) ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 57 – LIBERAÇÃO DE O_2^- POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO *IN VIVO* COM BRY

Após estímulos como citocinas e fatores de crescimento, a enzima NOX, capaz de produzir O_2^- é estimulada, e passa a produzir esse radical tanto intra quanto extracelularmente (VEAL, *et al.*, 2007; BROWN; GRIENDLING, 2009). Uma vez gerado, O_2^- pode ser dismutado espontaneamente ou através da SOD a H_2O_2 ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$), o qual pode rapidamente se difundir através de membranas.

(KAUL; FORMAN, 1996; FORMAN; TORRES, 2001). Uma vez que o O_2^- liberado pelos macrófagos peritoneais foi diminuído e o H_2O_2 liberado foi aumentado, podemos sugerir que o tratamento com Bry CH200 pode estar atuando na reação de dismutação, provavelmente com efeito nas enzimas SOD.

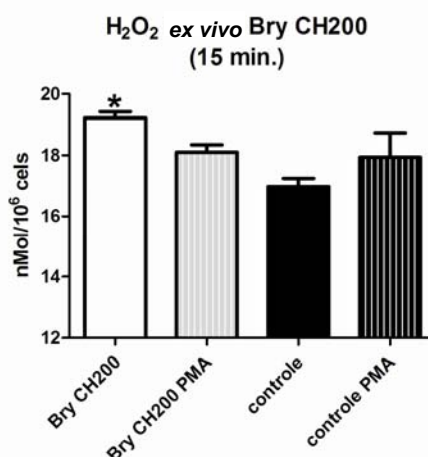


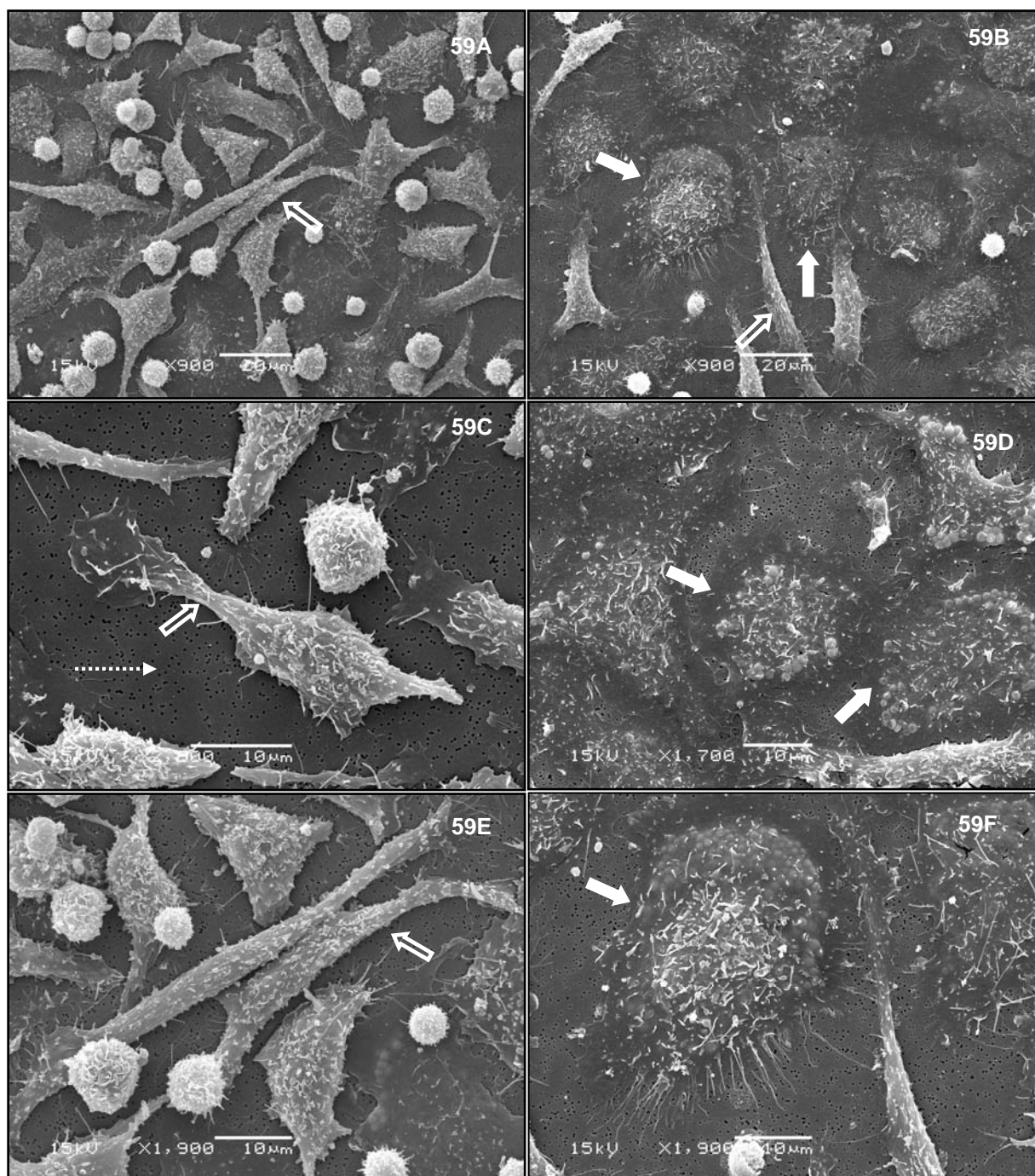
Gráfico mostrando a diminuição significativa na liberação de H_2O_2 (15 min. de incubação), quando comparado ao controle após tratamento *in vivo* (*) ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 58 – LIBERAÇÃO DE H_2O_2 POR MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO *IN VIVO* COM BRY

Pré tratamento de células microgлияis, tipo de macrófago do cérebro, com IFN- γ protege essas células do estresse oxidativo via selectiva aumento dos níveis de Mn-SOD (Magnésio superóxido dismutase) e atividade de Mn-SOD (CHENA, *et al.*, 2009). De fato, OLIVEIRA, 2005 mostrou que macrófagos peritoneais aumentam a liberação de IFN- γ no sobrenadante celular, quando tratados com Bry CH200. Como a membrana celular não é permeável ao O_2^- , o produto da atividade da NOX somente pode modular vias de sinais intracelulares, uma vez que este seja convertido a H_2O_2 , o qual pode difundir-se livremente através das membranas. Este radical pode funcionar como segundo mensageiro dentro da própria célula produtora, ativando vias de sinalização, como a do NF- κ B, ou ainda funcionar como sinalizador intercelular (LI; KARIN, 1999; RETH, 2002). O H_2O_2 por si só, não tem grande potencial destrutivo, portanto, esse radical produzido e liberado por macrófagos ativados é primeiramente proposto como ativador de macrófagos e linfócitos e não como destruidor de microorganismos (RETH, 2002).

MEV de macrófagos em co-cultura

Após 96 horas, a membrana da placa de co-cultura foi retirada e processada para MEV. Os macrófagos tratados com Bry CH200 mostraram morfologia de ativado, diferente do controle, o qual apresentou morfologia de residente (FIGURA 59). Macrófagos ativados mostram grandes projeções da membrana plasmática, aumento na capacidade de adesão e espalhamento no substrato, aumento da fagocitose, aumento no número de fagolisossomos e vesículas endocíticas e núcleo grande e eucromático. (NORTH, 1978). Em Oliveira (2005), o tratamento *in vitro* por 48h com Bry CH200 mostrou aumentar o número de macrófagos ativados, sem, no entanto, ser significativo. Provavelmente, o tempo de cultivo tenha sido decisivo para o aumento significativo do número de macrófagos ativados.

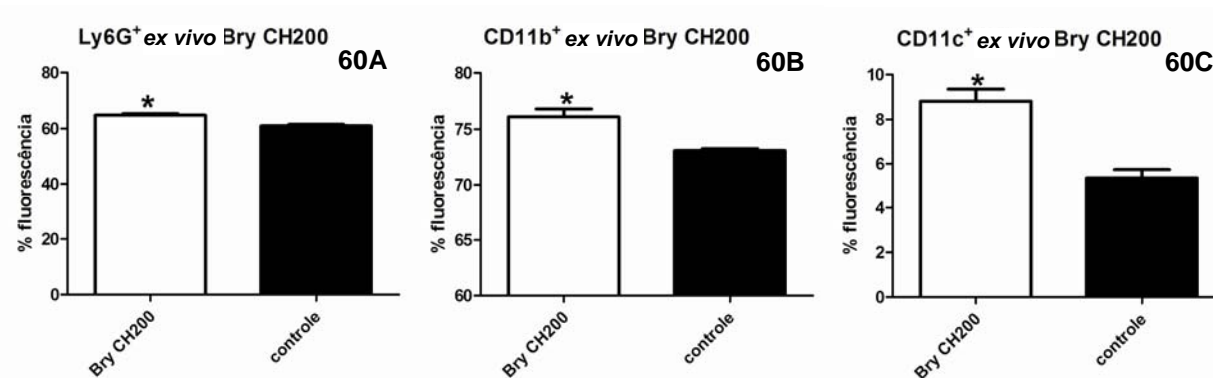


MEV de macrófagos co-cultivados com medula óssea por 96 horas. A, C, e E - macrófagos controle, B, D e F - tratados com Bry CH200. Setas abertas = macrófagos residentes; setas fechadas = macrófagos ativados; seta tracejada = poros da membrana

FIGURA 59 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM BRY EM CO-CULTURA

Imunofenotipagem das células da medula óssea

Após tratamento dos camundongos com Bry CH200, as células da medula óssea foram incubadas com anticorpos contra marcadores para linhagem hematopoiética. A análise em citometria de fluxo mostrou um aumento na expressão de CD11b, CD11c e Ly6G (FIGURA 60).



(*) aumentou significativamente em relação ao controle ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 60 – Ly6G⁺, CD11b⁺, E CD11c⁺ EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS TRATAMENTO *IN VIVO* COM BRY

O antígeno Ly-6G é um antígeno de diferenciação mielóide. A expressão de Ly-6G aumenta durante a diferenciação de granulócitos com alta expressão sobre granulócitos maduros. Sua expressão é também transitamente detectada durante diferenciação de monócitos, mas não é detectável em monócitos maduros. Não é expresso em células progenitoras hematopoiéticas (FLEMING, *et al.*, 1993; HESTDAL, *et al.*, 1991). CD11b e CD11c são expressos em monócitos, macrófagos, células dendríticas, polimorfonucleares e células Natural Killers. O que varia é a quantidade relativa dessas integrinas conforme o tipo de célula e seu estado de ativação ou diferenciação (ARNAOUT, 1990; GEORGAKOPOULOS *et al.*, 2008). Nas CTHs, CD11b/CD18 e CD11c/CD18 não estão presentes nas unidades formadoras de granulócitos e monócitos, mas são as primeiras detectadas durante a diferenciação de monócitos e granulócitos nos estágios mielocíticos e monoblásticos (ARNAOUT, 1990; KISHIMOTO *et al.*, 1990, YANG *et al.*, 2007). Com esses resultados, pode-se dizer que Bry CH200 administrada aos camundongos atua na diferenciação de praticamente todos os precursores da linhagem mielóide, tanto nas

células em início de diferenciação quanto nas fases finais, dando provável origem a granulócitos, monócitos e células dendríticas.

CD11b⁺ em células de medula óssea

O tratamento *in vitro* da medula óssea com Bry CH200 não alterou a marcação de células CD11b⁺ (dados não mostrados). No entanto, após co-cultivar essas células com macrófagos peritoneais, ocorreu um aumento na marcação de células CD11b⁺ aderentes da medula e uma diminuição na marcação das células não aderentes (FIGURAS 61).

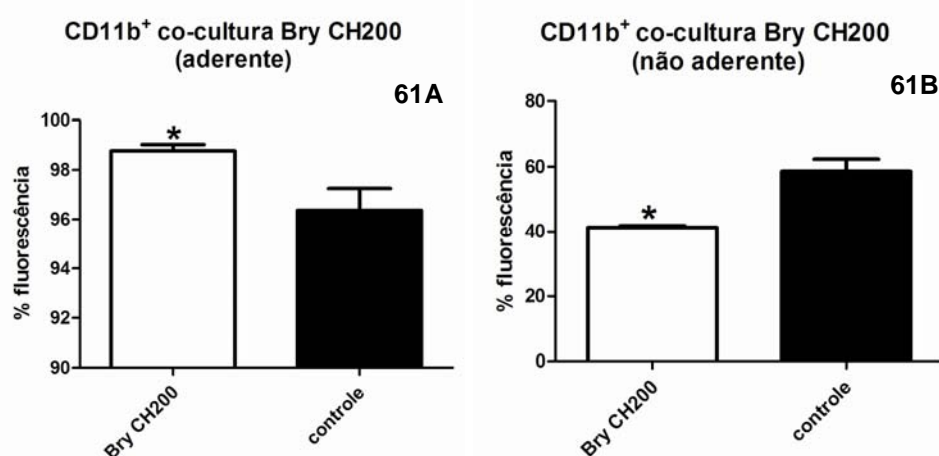
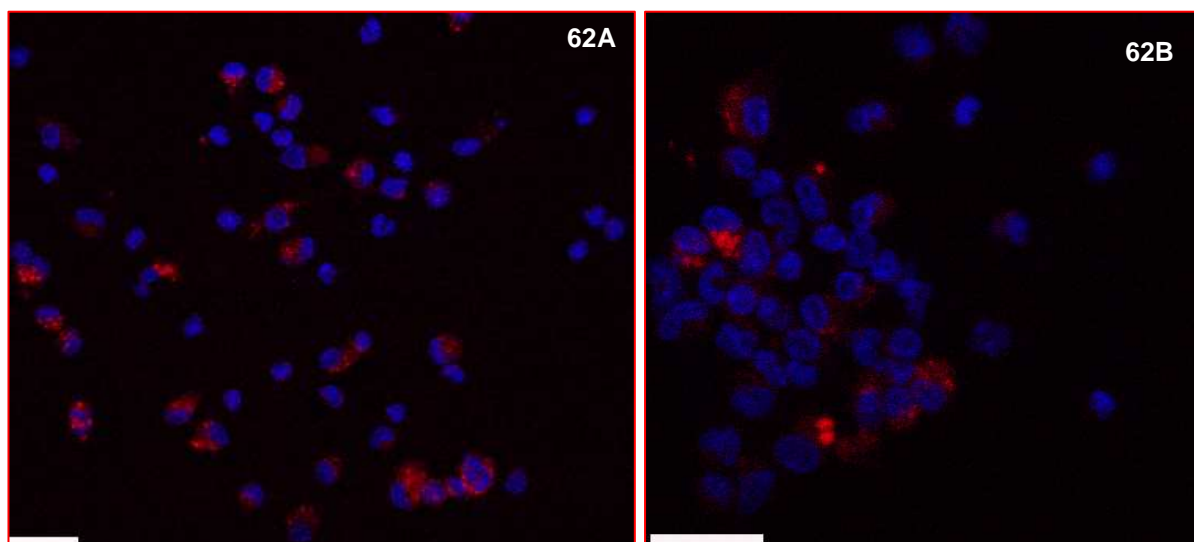


Gráfico 61A - (*) aumentou significativamente em relação ao controle Gráfico B - (*) diminuiu significativamente em relação ao controle ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como $\text{média} \pm \text{erro padrão}$.

FIGURA 61 – CD11b⁺ EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA APÓS CO-CULTURA COM MACRÓFAGOS TRATADOS COM BRY

Estes resultados *in vitro* mostram a ação do tratamento de Bry CH200 sobre os precursores mielóides de medula óssea, de maneira dependente de macrófagos. Bry CH200 juntamente com os macrófagos estimula a adesão das células CD11b⁺ com provável diferenciação. CD11b/CD18 são as primeiras moléculas detectadas durante a diferenciação de monócitos e granulócitos nos estágios mielocíticos e monoblásticos (ARNAOUT, 1990; KISHIMOTO *et al.*, 1990, YANG *et al.*, 2007). As CTHs para se diferenciarem precisam estar aderidas ao estroma. Em cultura celular, depois de diferenciadas, algumas células, como granulócitos e células dendríticas, se desprendem ficando no sobrenadante da cultura. Outras, como monócitos, ficam fortemente aderidos (INABA, *et al.*, 1992). Assim, Bry CH200 estaria promovendo uma diferenciação de toda linhagem mielocítica com ênfase em monócitos. Essa

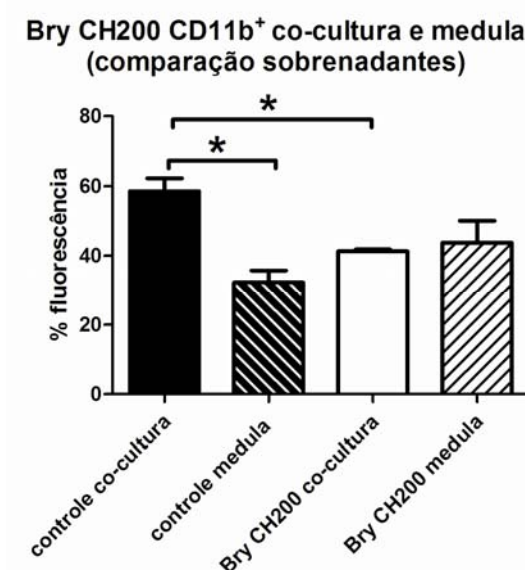
diferenciação pode ser induzida devido a IFN- γ . Essa citocina possui ação sobre células mielomonocíticas, induzindo diferenciação de monócitos em células de medula óssea (GESSANI; BELARDELI, 1998). De fato, Bry CH200 induz produção de IFN- γ em macrófagos peritoneais após tratamento *in vitro* (OLIVEIRA, 2005).



Cd11b com ficoeritrina (vermelho). Núcleo com DAPI (azul). Detecção em microscopia confocal. 62A- grupo controle; 62B – grupo tratado com BRY CH200. Barra: 20 μ m; Aumento: 40X

FIGURA 62 – CD11b⁺ EM CÉLULAS ADERENTES DE MEDULA ÓSSEA APÓS CO-CULTURA COM MACRÓFAGOS TRATADOS COM BRY

Quando se comparam as marcações de células CD11b⁺ medula óssea, pode-se verificar que o controle da medula em co-cultura possui uma maior número significativo na marcação CD11b⁺ quando se compara ao controle da medula *in vitro*. Dessa forma, podemos sugerir que o macrófagos, por si só, possui efeito proliferativo sobre as células da medula óssea. No entanto, após o tratamento da co-cultura com Bry CH200 observa-se uma diminuição das células marcadas com CD11b⁺ no sobrenadante da co-cultura (FIGURA 63). As células não aderentes diminuem e a porcentagem de fluorescência se aproxima daquela encontrada nas células não aderentes da medula. Esta ocorrência pode significar uma indução da diferenciação das células CD11b⁺, uma vez que esse fenômeno é dependente de adesão celular. Com estas observações, pode-se sugerir que Bry CH200 possui ação de diferenciação e adesão dependente de macrófagos.



(*) aumentou significativamente ($P < 0.05$). Todos os resultados são expressos como $\text{media} \pm \text{erro padrão}$.

FIGURA 63 – CD11b⁺ DE CÉLULAS NÃO ADERENTE EM CULTURA E CO-CULTURA.

Neste trabalho foi verificado a capacidade da *Bryonia alba* na potência CH200 ativar funções dos macrófagos e alterar marcadores da linhagem hematopoiética da medula óssea. Após tratamento de camundongo com Bry CH200, pode-se verificar que este medicamento altera a liberação de ROS. O aumento na produção de H_2O_2 sugere que esse medicamento atua como um ativador de macrófagos e linfócitos, uma vez que esse radical sozinho não tem grande potencial destrutivo. A ação da *Bryonia alba* nas potências CH4 e CH9 também foi observada sobre polimorfonucleares, onde o medicamento apresenta um efeito estimulatório sobre o seu metabolismo oxidativo (BELLAVITE *et al.*, 2006). Bry CH200 mostrou ação também sobre as células da medula óssea dos camundongos. Com o aumento de marcadores encontrados na linhagem mielocítica, pode-se dizer que Bry CH200 atua em todas as etapas da diferenciação dessa linhagem, dando provável origem a granulócitos (Ly-6G^+), monócitos (CD11b^+) e células dendríticas (CD11c^+). Bry CH200 mostrou possuir ação sobre a ativação morfológica de macrófagos. Macrófagos ativados produzem diversas substâncias que interferem no sistema imunológico. De fato, podemos observar a ação de substâncias produzidas por macrófagos em células de medula óssea, após co-cultivo desses dois grupos celulares. Neste caso, substâncias produzidas por macrófagos, provavelmente

estimulam a proliferação celular e quando o grupo recebeu tratamento com Bry CH200 demonstrou ter um maior número de células da linhagem mielocíticas aderidas do que no controle. Assim, com esses os resultados, Bry CH200 mostra efeito bem definido sobre as células precursoras mielocíticas, desde o início de sua diferenciação, até as células maduras (neste caso, macrófagos) colaborando para a defesa do organismo com as células de defesa iniciais e que ligam o sistema imunológico inato ao adaptativo. A atividade efetora antimicrobiana dos fagócitos (macrófagos e células dendríticas e neutrófilos) é crucial na defesa inata do hospedeiro contra infecções. Como resultado de uma origem comum dos fagócitos, eles compartilham diversas funcionalidades, incluindo ávida fagocitose, comportamentos-chaves sob condições inflamatórias/infeciosas, e atividades antimicrobianas e imunomodulatórias. No entanto, devido às consequências da especialização durante suas diferenciações, macrófagos e neutrófilos adquirem distintas mas complementares características que dão origem a diferentes níveis de capacidades antimicrobianas e citotoxicidade, diferentes localizações nos tecidos e tempo de vida. A combinação dessas características complementares e sobrepostas dos fagócitos promove sua cooperativa participação como efetores e moduladores da imunidade inata contra infecções e como orquestradores da imunidade adaptativa. Nas atividades antimicrobianas da imunidade inata, macrófagos e neutrófilos não são capazes de substituir um ao outro. O uso por mamíferos de um sistema com dois dedicados fagócitos trabalhando cooperativamente representa uma vantajosa estratégia de ataque que permite o eficiente e seguro uso de poderosas, mas perigosas moléculas de ataque (SILVA, 2010).

7 CONCLUSÕES

7.1 Conclusão geral

Todas as substâncias altamente diluídas de forma homeopática alteram a liberação de espécies reativas e a expressão de marcadores de células de medula óssea.

7.2 Conclusões específicas

Com os resultados obtidos neste trabalho de doutorado, podemos concluir que os medicamentos homeopáticos estudados,

- Todos os medicamentos mostram agir sobre a liberação de espécies reativas por macrófagos peritoneais de camundongos associados ou não a fagocitose, promovendo melhora na defesa celular e redução de estresse oxidativo.
- A maioria dos medicamentos provavelmente desvia a produção de ROS e RNS para a morte e destruição do microorganismo, quando ha interação com leveduras.
- Ativam morfologicamente macrófagos co-cultivados com medula óssea.
- Alteram a expressão do marcador CD11b em células de medula óssea tratadas *in vitro* e co-cultivadas com macrófagos, promovendo proliferação e/ou diferenciação dos precursores mielóides
- Alteram a expressão de marcadores da linhagem hematopoiética após tratamento dos camundongos, atuando na diferenciação e/ou proliferação destas células.

Considerações finais

Terapias focadas no estímulo e recrutamento de macrófagos tem sido foco de pesquisas relacionadas à resolução de diversas doenças, visando a imunoterapia contra células neoplásicas, processos infecciosos, inflamatórios e na modulação da resposta imunológica. Todos os medicamentos homeopáticos estudados nesse trabalho mostraram atuar de alguma maneira sobre macrófagos, tanto diferenciados

quanto em seus precursores, assim como nas demais células precursoras do sistema imunológico presentes na medula óssea. Os resultados aqui encontrados, mostrando ação dessas substâncias altamente diluídas na liberação de espécies reativas permitem supor um real potencial terapêutico de baixa ou nenhuma toxicidade, uma vez que essas moléculas, mesmo em pequeníssimas quantidades, conseguem atuar como segundo mensageiros e modular diferentes respostas em diferentes células. A vasta biodiversidade encontrada no Brasil, juntamente com a grande diversidade étnica e cultural que usa produtos naturais como tradição é uma fonte promissora de novas estratégias terapêuticas. A melhoria de instalações e de infraestrutura são essenciais para o progresso técnico e científico na saúde pública. Nossos resultados pontuam a necessidade de um exame cuidadoso na interface entre medicamentos homeopáticos e o tratamento de doenças. Esta é uma área importante para futuras pesquisas, pois à medida que esses conhecimentos se expandem, aumenta a esperança de termos a habilidade de influenciar seletivamente um estado de ativação celular específico, permitindo manipular uma terapia resolutiva.

REFERÊNCIAS

ABUD, A.R.; CESAR, B.; CAVAZZANI, L. M.; OLIVEIRA, C. C.; GABARDO, J.; BUCHI, D. F. Activation of bone marrow cells treated with Canova *in vitro*. **Cell Biology International**, v. 30, p.808-816, 2006.

ARNAOUT, M. A.; Structure and Function of the Leukocyte Adhesion Molecular CD11/CD18. **Blood**, v.75, n.5, 1990.

ARONSON, J. K. Mercury and mercurial salt. In: ARONSON, J. K. Meyler's side effects of drugs. **The international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions**, 5th ed. Elsevier, Oxford, United Kingdom: 2006a, p. 2260-2266.

ARONSON, J. K. Arsenic. In: ARONSON, J. K. Meyler's side effects of drugs. **The international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions**, 5th ed. Elsevier, Oxford, United Kingdom: 2006b, p. 2260-2266..

ARUOMA, O. Free radicals, oxidative estresse and antioxidants in human health and disease. **J. Am. Oil Chemists Soc.**, v. 75, p.199–212, 1998.

BAROLLO, C. R. **Aos que se tratam pela Homeopatia**. 7ºed., São Paulo: 1995, ed Typus.

BHANDOOLA, A.; SAMBANDAM, A. ; ALLMAN, D.; MERAZ, A. ; SCHWARZ, B. Early T Lineage Progenitors: New Insights, but Old Questions Remain. **J. Immunol.**, v.171, p. 5653-5658, 2003.

BHANDOOLA, A.; SCHWARZ, B. A. Trafficking from the bone marrow to the thymus: a prerequisite for thymopoiesis. **Immunological Reviews**, v. 209, p. 47–57, 2006.

BELLAVITE, P.; CONFORTI, A.; PIASERE, V.; ORTOLANI, R. Immunology and Homeopathy. 1. Historical Background. **eCAM**, v.2, n. 4, p. 441-452, 2005. doi:10.1093/ecam/neh141

BELLAVITE, P.; CONFORTI, A.; PONTAROLLO, F.; ORTOLANI, R.; Immunology and Homeopathy. 2. Cells of the Immune System and Inflammation. **eCAM**, v. 3, n. 1, p. 13-24, 2006. doi: 10.1093/ecam/nek018

BELON, P.; BANERJEE, A.; KARMAKAR, S.R.; BISWAS, S.J.; CHOUDHURY, S. C.; BANERJEE, P.; DAS, J.K.; PATHAK, S.; GUHA, B.; PAUL, S.; BHATTACHARJEE, N.; KHUDA-BUKHSH, A.R. Homeopathic remedy for arsenic toxicity?: Evidence-based findings from a randomized placebo-controlled doubled blind human trial. **Science of the Total Environment** , v. 384, p. 141-150, 2007. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.06.001

BEDARD, K.; KRAUSE, K. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. **Physiol Rev**, v. 87, p. 245–313, 2007. doi:10.1152/physrev.00044.2005.

BERNAL-OCHOA, F.; RUIZ-HERNANDEZ, A.; BERNAT, R. Lachesis muta 200 as a hypotensive. **British Homoeopathic journal**, v.86, n. 1, p.35-36, 1997.

BONTKES, H. J.; de GRUIJL, T. D.; SCHUURHULS, G. J. ; SCHEPER, R. J. ; MEIJER, C. J. L. M. ; HOOLJBERG, E. Expansion of dendritic cell precursor from human CD34+ progenitor cells isolated from healthy donor blood; growth factor combination determines proliferation rate and functional outcome. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 72, 321-329, 2002.

BOWDISH, D.M.E.; LOFFREDO, M.S., MUKHOPADHYAY, S., MANTOVANI, A, GORDON, S. Macrophage receptors implicated in the “adaptive” form of innate immunity. **Microbes and Infection**, v.9, 2007. doi:10.1016/j.micinf.2007.09.002

BROWN, D.I.; GRIENDLING, K. K. Nox proteins in signal transduction. **Free Radical Biology & Medicine**, v.47, p. 1239-1253, 2009. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.023.

BRUCKDORF, R. The basics about nitric oxide. **Molecular aspects of medicine**, v.26, p. 23-31, 2005.

CADENAS, S.; CADENAS, A. M. Flighiting the stranger-antioxidante protection against endotoxin toxicity, **Toxicology**, p. 45-63, 2002.

CESAR, B.; ABUD, A.P.R.; DE OLIVEIRA, C.C.; CARDOSO, F.; GREMSKI, W.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Activation of mononuclear bone marrow cells treated *in vitro* with a complex homeopathic medication. **Micron**, v. 39, n. 4, p. 461-470, 2008.

CESAR B, ABUD AR, DE OLIVEIRA, CC, CARDOSO F, DI BERNARDI RP.; GUIMARÃES FSF, GABARDO J, BUCHI DF. Treatment with at Homeopathic Complex Medication Modulates Mononuclear Bone Marrow Cell Differentiation. **eCAM**, 2009.*in press* dói: 10.1093/ecam/nep119.

CHANG, L. C; SONG, L. L.; PARK, E. J.; LUYENGI, L.; LEE, K. J.; NORMAN, R. Bioactive Constituents of *Thuja occidentalis*. **Journal of Natural Product**, v.63, p.1235-1238, 2000.

CHENA, X.; CHOIB, Y.; CHANGC, T-S.; NOHC, Y. H.; SHIND, C. Y.; WUA, C-F.; KOE, K. H.; KIM, W-K. Pretreatment with interferon-γ protects microglia from oxidative estresse via up-regulation of Mn-SOD. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 8, p. 1204-1210, 2009. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.01.027

CITTERIO, S., RESCIGNO, M., FOTI, M., GRANUCCI, F., AGGUJARO, D., GASPERI, C., MATYSZAK, M. K., GIROLOMONI, G., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Dendritic cells as natural adjuvants. **Methods**, v. 19, p. 142-147, 1999.

CLARK, G. J.; ANGEL, N.; KATO, M.; LÓPEZ, J. A.; MACDONALD, K.; VUCKOVIC, S.; HART, D. N.J. The role of dendritic cells in the innate immune system. **Microbes and Infection**, v.2, p. 257-272, 2000.

COFFMAN, R. L. Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development. **Immunol. Rev.**, v. 69, p. 5-23, 1982.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International immunopharmacology**, v.1, p. 1397-1406, 2001.

COUGOULE, C.; WIEDEMANN, A.; LIM, J.; CARON, E. Phagocytosis, an alternative model system for the study of cell adhesion. **Semin Cell Dev Biol**, v. 15, p. 679-689, 2004.

CRISTEA, A.; NICULA, S.; DARE, V. Pharmacodynamic effects of very high dilutions of Belladonna on the isolated rat duodenum. In: Bastide, M. (ed). Signals Images. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 161-170, 1997.

CROSS, A. R., SEGAL, A. W. The NADPH oxidase of professional phagocytes-prototype of the NOX electron transport chain systems. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1657,1-22, 2004.

DALE, C.D.; BOXER, L. ; LILES, W. C. ; The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, v.112, p.935-945, 2008. doi:10.1182/blood-2007-12-077917

DAMICO, D.C.S., BUENO, L.G.F., RODRIGUES-SIMIONI, L., MARANGONI, S. CRUZ-HÖFLING, NOVELLO, J.C.,. Neurotoxin and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. **Toxicon**, v. 46, p.222-229, 2005.

DAY, C. Aconitum napellus. **British Homoeopathic Journal**, v. 82, p. 97-105, 1993.

DAVE, V. P. Hierarchical role of CD3 chains in thymocyte development **Immunological Reviews**, v. 232, p. 22-33, 2009. 10.1111/j. 1600-065X.2009.00835.x

DEJARNETTE, J. B.; SOMMER, C. L. ; HUANG, K. ; WOODSIDE, K. J. ; EMMONS, R. ; KATZ, K. ; SHORES, E. W.; LOVE, P. E. Specific requirement for CD3ε in T cell development. **Immunology**, v. 95, p. 14909-14914, 1998.

DEININGER, M. W. M.; GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 96, n.10, p.3343-3356, 2000.

DENICOLA, A.; RADI, R. Peroxynitrite and drug-dependent toxicity. **Nitric Oxide, Cell Signalling and Death**, v. 15, n.2, p.273-288, 2005.

DUBEY, S. H.; BATRA, A. Anti diabetic activity of *Thuja occidentalis* Linn. **Research J. Pharm. and Tech.** v. 1, n.4, p. 362-365, 2008.

DUBEY, S. H.; BATRA, A. Role of *Thuja occidentalis* Linn. in prevention of congestive heart disease. **Journal of Pharmacy Research**, v. 2, n.4, p.651-654, 2009a.

DUBEY, S. H.; BATRA, A. ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF *THUJA OCCIDENTALIS* LINN. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 2, n. 1, p. 73-76, 2009b.

ERNST, E. Adverse effects of herbal drugs in dermatology. **Br. J. Dermatol.** v. 143, 923-929, 2000.

FIMIANI, V.; CAVALLARO, A.; AINIS, O.; BOTTARI, C. Immunomodulatory effect of the homeopathic drug Engystol-N on some activities os isolated human leukocytes and in whole blood. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.** v. 22, p.103-115, 2000.

FLEMING, T. J.; M. L. FLEMING, T. J.; MALEK, T. R. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. **The Journal of Immunology**, v. 151, n. 5, p. 2399-2408, 1993.

FISHER, P. How does homeopathy work: are we looking in the right place? **Homeopathy**, vol. 92, p. 1-2, 2003.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. **Molecular Aspects of Medicine**, v.22, p.189-216, 2001.

FRASS, M.; LINKESCH, M.; BANYAI, S.; RESCH, G.; DIELOCHER, C.; LO, T.; ENDLER, C.; HAIDVOGL, M.; MUCHITSCH, I.; SCHUSTER, E.; Adjunctive homeopathic treatment in patients with severe sepsis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in an intensive care unit. **Homeopathy**, v. 94, p.75-80, 2005.

GEORGAKOPOULOS, T.; MOSS, S. T.; KANAGASUNDARAM, V. Integrin CD11c contributes to monocyte adhesion with CD11b in a differential manner and requires Src family kinase activity. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 3671-3681, 2008.

GESSANI, S.; BELARDELLI, F. IFN- γ Expression in Macrophages and Its Possible Biological Significance. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 9, n. 2, p.117-123, 1998.

GORDON, S. The role of the macrophage in immune regulation. **Res. Immunology** 149, 685-688, 1998.

GORDON, S. Macrophages and the immune response. **Fundamental Immunology**. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, p. 533-545, 1999.

GORDON S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**; v. 3, p. 23-25, 2003.

GORDON, S.; TAYLOR, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity, **Nature Reviews Immunology**, v.5, p. 953-964, 2005. doi:10.1038/nri1733

GREEN, L.C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N] -nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, p.131-138, 1982.

GRISHAM, M.B.; JOURD'HEUIL, D.; WINK, D.A. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. **Am. J. Physiol.**, v. 276, 315-321, 1999.

GRUDEN-MOVSESIJAN, A., MILOSAVLJEVIC, L.J.S. The involvement of the macrophage mannose receptor in the innate response to infection with parasite *Trichinella spiralis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 109, p. 57-67, 2006.

GUIMARÃES, F.S.F.; ABUD, A.P.R.; OLIVEIRA, S.M.; OLIVEIRA, C.C.; CESAR, B.; DONATTI, L.; GABARDO, J.; TRINDADE, E.S.; BUCHI, D.F. Stimulation of lymphocyte anti-melanoma activity by co-cultured macrophages activated by complex homeopathic medication. **BMC Cancer**, v. 9, p.293, 2009. doi: 10.1186/1471-2407-9-293

GUIMARÃES, F. S. F.; ANDRADE, L. F.; MARTINS, S. T.; ABUD, A. P. R.; SENE, R. V.; WANDERER, C.; TISCORNIA, I.; BOLLATI-FOGOLÍN, M.; BUCHI, D. F.; TRINDADE, E. S. *In vitro* and *in vivo* anticancer properties of a *Calcareo carbonica* derivative complex (M8) treatment in a murine melanoma model. **BMC Cancer**, v. 10, n. 113, p. 2-14, 2010. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/113>

GUNSILIUS, E.; GASTL, G.; PETZER, A. L. Hematopoietic stem cells. **Biomed Pharmacother**, v. 55, p. 186-194, 2001.

HALL, A.H. Chronic arsenic poisoning. **Toxicol. Lett.** v.128, p. 69-72, 2002

HAYFIELD, R. **Vida nova: homeopatia. Remédios simples para uma saúde natural**. Lisboa: editora estampa Ltda, 1999.

HAN, Y.; KWON, Y.; CHUNG, H.; LEE, S.; SIMMONS, R.L.; BILLIAR, T. R.; KIM, Y. Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF- κ B activation: role of H_2O_2 and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophage. **Nitric oxide: biology and Chemistry**. v.5, p. 504-513, 2001.

HÁJEK, R.; BUTCH, A. W. Dendritic cell biology and the application of dendritic cells to immunotherapy of multiple myeloma. **Med Oncol.** , v. 17, n. 1, p. 2-15, 2000.

HARRIS, E. S.; MCINTYRE, T. M.; PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A. The Leukocyte Integrins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 31,f.4, p. 23409-23412, 2000. DOI 10.1074

HASEGAWA, K.; NISHIMURA, H.; OGAWA, S.; HIROSE, S.; SATO, H.; SHIRAI, T. Monoclonal antibodies to epitope of CD45R (B220) inhibit interleukin 4-mediated B cell proliferation and differentiation. **Int. Immunol.** , v. 2, n. 4, p. 367-375, 1990.

HAUKE W, KÖHLER G, HENNEICKE-VON ZEPELIN HH, FREUDENSTEIN J. Esberitox®N as Supportive therapy when providing standard antibiotic treatment in subjects with a severe bacterial infection (acute exacerbation of chronic bronchitis). **Chemotherapy**, v. 48, p. 259–66, 2002.

HESTDAL, K.; RUSCETTI, F. W.; IHLE, J. N.; JACOBSEN, S. E.; DUBOIS, C. M.; KOPP, W. C.; LONGO, D. L.; KELLER, J. R. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells, **The Journal of Immunology**, v.147, n. 1, 22-28, 1991.

HONG, S.; JEONG, H.; CHUNG, H.; KIM, H; CHAE, H.; SHIN, T.; SEO, Y., KIM, H. An herbal formula, Herbkines, enhances cytokines production from immune cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 149-155, 2005.

HUME, D. A. The mononuclear phagocyte system. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, p. 49.53, 2006. DOI 10.1016/j.coi.2005.11.008

HURLEY, R. W.; MCCARTHY, J. B.; VERFAILLIE, C. M. Direct Adhesion to Bone Marrow Stroma via Fibronectin Receptors Inhibits Hematopoietic Progenitors proliferation. **J. Clin. Invest.** v. 96, 511-519, 1995.

IMADA, C.; HASUMURA, M.; NAWA, K. Promotive effect of macrophage colony-stimulating factor on long-term engraftment of murine hematopoietic stem cells. **Cytokine**, v.31, p.447–453, 2005.

INABA, K.; INABA, M.; ROMANI, N.; AYA, H.; DEGUSHI, M.; IKEHARA, S.; MURAMATSU, S.; STEINMANLL, R. M. Generation of Large Numbers of Dendritic Cells from Mouse Bone Marrow Cultures Supplemented with Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating. **Exp. Med.** ,v. 176, p. 1693-1702, 1992.

JACOBS, J.; HERMAN, P.; HERON, K.; OLSEN, S.; VAUGHTERS, L. Homeopathy for Menopausal Symptoms in Breast Cancer Survivors: A Preliminary Randomized Controlled Trial. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.11, n.1, p. 21-27, 2005.

JANDUS, C.; BIOLEY, G.; SPEISER, D. E.; ROMERO, P. Selective accumulation of differentiated FOXP3+ CD4+ T cells in metastatic tumor lesions from melanoma patients compared to peripheral blood. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, v. 57, n.12, p. 1795-1985, 2008.

JANEWAY, C.; TRASVERS, P.; WALPORT, M.; SHOMCHIK, M.J. **Imunobiologia**. Sexta edição, editora Artmed, 2007.

JONAS, W.; KAPTCHUK, T.J.; LINDE, K. A critical overview of homeopathy. **Annals of Internal Medicine**, vol. 138, p. 393-399, 2003.

JONAS, W.B.; JACOBS, J. **A cura através da homeopatia**. Rio de Janeiro, editora Campus: 1996.

JONES, R.D., HANCOCK, J. T., MORICE, A.H.. NADPH oxidase: A universal oxygen sensor? **Free Radic Biol Med**, v. 29, n. 5, p. 416-424, 2000.

JOHNSTON, R.B.; GODZIK, C.A.; COHN, Z.A. Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, vol. 148, p. 115-127, 1978.

KAUL, N.; FORMAN, H. J. Activation of NFkB by the respiratory burst of macrophages. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 21, n. 3, p. 401-405, 1996.

KERRIGAN, A. M.; BROWN, G. D. C-type lectins and phagocytosis. **Immunobiology**, v.214, p. 562-575, 2009. doi:10.1016/j.imbio.2008.11.003

KHUDA-BUKHSH, A. Potentized homoeopathic drugs act through regulation of gene expression: a hypothesis to explain their mechanism and pathways of action *in vitro*. **Complementay Therapies in Medicine**, vol. 5, p. 43-46, 1997.

KHUDA-BUKHSH, A. R. ; PATHAK, S. ; GUHA, B.; KARMAKAR, S.R.; DAS, J.K.; BANERJEE, P.; BISWAS, S.J.; MURKHERJEE, P.; BHATTACHARJEE, N.; CHOUDHURY, S.C.; BANERJEE, A.; BHADRA, S.; MALICK, P.; CHAKRABARTI, J.; MANDALA, B. Can Homeopathic Arsenic Remedy Combat Arsenic Poisoning in Humans Exposed to Groundwater Arsenic Contamination?: A Preliminary Report on First Human Trial. **eCAM**, v. 2, n. 4, p.537-548, 2005. doi:10.1093/ecam/neh124

KLEIN, F.; FELDHAHN, N.; LEE, S.; WANG, H.; CIUFFI, F.; VON ELSTERMANN, M.; TORIBIOS, M. L.; SAUER, H.; WARTENBERG, M.; BARATH, V. S.; KRÖNKE, M.; WERNETT, P. ROWLEY, J. D.; MUSCHEN, M. T lymphoid differentiation in human bone marrow. **PNAS**, v.100, n.11, p.6747-6752, 2003. doi: 10.1073/pnas.1031503100

KIM, S.H.; JOHNSON, V. J.; SHARMA, R. P. Mercury inhibits nitric oxide production but activates proinflammatory cytokine expression in murine macrophage: differential modulation of NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways. **Nitric Oxide**, v. 7; p. 67–74, 2002

KLIMP, A. H.; DE VRIES, E. G. E.; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEM, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer, **Critical Reviews in Oncology/hematology**, v. 44, p. 183-161, 2002.

KISHIMOTO, K. T.; LARSON, R. S.; CORBI, A. L.; DUSTIN, M. L.; STAUTON, D. E.; SPRINGER, T. A.; The Leukocyte Integrins. In: DIXON, F. J. **Advances in immunology**, San Diego, Califórnia: Academic press, v. 46, 1990, p149-182.

KONDO, M., WAGERS, A.J., MANZ, M.G., PROHASKA, S.S., SCHERER, D.C., BEILHACH, G.F., SHIZURU, J.A., WEISSMAN, I.L. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. **Annual Review of Immunology** v. 21, p. 759-806, 2003.

KORBLING, M.; ESTROY, Z. Adult stem cells for tissue repair – a new therapeutic concept? **N Engl J Med**, v. 349, n 6, p. 570-582, 2003.

KRAUZE-BARANOWSKA, M.; CISOWSKI, W. Flavone c-glycosides from *Bryonia alba* and *B. dioica*. **Phytochemistry**, vol. 39(3), p. 727-729, 1995.

KRIS-ETHERTON, P. M.; LICHTENSTEIN, A. H.; HOWARD, B. V.; STEINBERG, D.; WITZTUM, J. L. Antioxidant vitamin supplements and cardiovascular disease. **Circulation**, v.110, p.637–641, 2004.

KUSMARTSEV, S.; GABRILOVICH, D. I.; Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species, *Journal of Leukocyte Biology*, v. 74, p. 1-11, 2003. doi:10.1189/jlb.0103010

LAI, A.; KONDO, M. T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. **Semin Immunol**. v. 20, n. 4, p. 207–212, 2008. doi:10.1016/j.smim.2008.05.002.

LI, N.; KARIN, M. Is NF- κ B the sensor of oxidative estresse? **The FASEB Journal**, vol. 13, p. 1137-1143, 1999.

LINARES, E.; GIORGIO S.; MORTARA, R. A.; SANTOS, C. X. C., YAMADA, A. T.; AUGUSTO, O. Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. **Free Radic. Biol. Med.** v. 30, n. 11, p. 1234-42, 2001.

LOPES, L.; GODOY, L.M.F.; DE OLIVEIRA, C.C.; GABARDO, J.; SCHADECK, .J.G.; BUCHI, D.F. Phagocytosis, endosomal / lisosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron**, v. 37, p. 277-287, 2006.

LU, J.; CHEW, E.; HOLMGREN, A.; Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide. **PNAS**, v.104, n. 30, p.12288-12293, 2007. doi_10.1073_pnas.0701549104

LUNA, A. L.; ACOSTA-SAAVEDRA, L. C.; LOPEZ-CARRILLO, L.; CONDE, P.; VERA, E.; DE VIZCAYA-RUIZ, A.; BASTIDA, M.; CEBRIAN, M. E.; CALDERON-ARANDA, E. S. Arsenic alters monocyte superoxide anion and nitric oxide production in environmentally exposed children. **Toxicology and Applied Pharmacology**, *In Press, Corrected Proof*, 2010.

MANDUCA, P.; MARCHISIO, S.; ASTIGIANO, S.; ZANOTTI, S.; GALMOZZI, F.; PALERMO, C.; PALMIERI, D. FMS*Calciumfluor specifically increases mRNA levels and induces signaling via MAPK 42,44 and not FAK in differentiating rat osteoblasts. **Cell Biology International**, vol. 29, p. 629-637, 2005.

MARKS, CASSANDRA. **Homeopatia: guia prático**. São Paulo: Callis Editora Ltda, 1997.

MATHIE, R.T. The research evidence base for homeopathy: a fresh assessment of the literature. **Homeopathy**, vol. 92, p. 84-91, 2003.

MELLMAN, I. Antigen processing and presentation by dendritic cells: cell biological mechanism. **Adv Exp Med Biol**, v. 560, p. 63-67, 2005.

MITRA, K.; KUNDU, S.N.; KHUDA BUKHSH, A.R. Efficacy of a potentized homeopathic drug (Arsenicum Album-30) in reducing toxic effects produced by arsenic trioxide in mice: I. On rate of accumulation of arsenic in certain vital organs. **Complementary Therapies in Medicine**, vol. 6, p. 178-184, 1998.

MITRA, K.; KUNDU, S.N.; KHUDA BUKHSH, A.R. Efficacy of a potentized homeopathic drug (Arsenicum Album-30) in reducing toxic effects produced by arsenic trioxide in mice: II. On alterations in body weight, tissue weight and total protein. **Complementary Therapies in Medicine**, v.7, p. 24-34, 1999.

MOLIFE, R.; HANCOCK, B.W. Adjuvant therapy of malignant melanoma. **Current Reviews in Oncology/Hematology**, v. 44, p. 81-102, 2002

MONROE, J. G.; DORSHKIND, K. Fate decisions regulating bone marrow and peripheral B lymphocyte development. **Adv. Immunol.**, v. 95, p. 1-50, 2007. doi:10.1016/S0065-2776(07)95001-4

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation, v.8, p. 958-969, 2008, doi:10.1038/nri2448.

MÜLLER-SIEBURG, C.E., DERYUGINA, E. The stromal cells: guide to the stem cell universe. **Stem Cells** vol, 13, p. 477-486, 1995.

MURPHY, M.P., PACKER, M.A., SCARLETT, J.L., MARTIN, S.W. Peroxynitrite: a biologically significant oxidant. **Gen Pharmacol**, v. 31, n.2, 179-86, 1998.

MURTAUGH, M. P., FOSS, D. L, Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.87, p.109-121, 2002.

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **PNAS**, v. 97, n. 16, p. 8841–8, 2000.

NASER, B.; BODINET, C.; TEGTMEIR, M.; LINDEQUIST, U. *Thuja occidentalis* (Arbor vitae): A review of its pharmaceutical, pharmacological and clinical properties. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, vol. 2, n. 1, p. 69-78, 2005.

NYGREN, H.; BROBERG, M.; ERIKSSON, C.; SAHLIN, H.; YAHYAPOUR, N. The respiratory burst response of surface-adhering leukocytes. A key to tissue engineering. **Colloids and Surfaces**, vol. 22, p. 87-97, 2001.

NOGUEIRA, G. W. G.; RIMOLI, M.A.; TURCI, M. B.; GUILHERME, S.D.; MOLLO, S. A.; BARNABÉ, V.D. **Doutrina Médica Homeopática**, São Paulo, Grupo de Estudos Homeopáticos de São Paulo “Benoit Mure”, 1986.

NORTH, R.J. The concept of the activated macrophage. **The journal of immunology**, v. 121, n. 3, p.806-809, 1978.

OBERBAUM, M.; GLATTHAAR-SAALMULLER, B.; STOLT, P.; WEISER, M., Antiviral Activity of Engystol®: An In Vitro Analysis. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.11, n.5, p.855-862, 2005.

OGAWA, M. Differentiation and Proliferation of Hematopoietic Stem Cells. **Blood**, v. 81, n.11, p. 2844-2853, 1993.

OLIVEIRA, S. M. TRIAGEM DE MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS QUE ATIVAM MACRÓFAGOS COM DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IFN- γ , IL-4 E NO. 122 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

OLIVEIRA, C.C.; OLIVEIRA, S. M.; GODOY, L.M.F.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. **Journal of Infection**, v. 52, p. 420-432, 2006.

OLIVEIRA, C.C.; OLIVEIRA, S.M.; GOES, V.M.; PROBST, C.M.; KRIEGER, M.A.; BUCHI, D.F. Gene expression profiling of macrophages following mice treatment with an immunomodulator medication. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 104, n.4, p. 1364-1377, 2008.

OLOFSSON, P.; HOLMBERG, J.; TORDSSON, J.; LU, S.; AKERSTRÖM, B.; HOLMDAHL, R. Positional identification of Ncf1 as a gene that regulates arthritis severity in rats. **Nature Genetics**, v.33, p. 25-32, 2002. doi:10.1038/ng1058

OLOFSSON, P.; NERSTEDT, A.; HULTQVIST, M.; NILSSON, E. C.; ANDERSSON, S.; BERGELIN, A.; HOLMDAHL, R. Arthritis suppression by NADPH activation operates through an interferon- β pathway. **BMC Biology**, v. 5, n. 19, 2007. doi:10.1186/1741-7007-5-19.

PALERMO, C.; FILANTI, C.; POGGI, S.;MANDUCA, P. Osteogenesis in vitro in rat tibia-derived osteoblasts is promoted by the homeopathic preparation, FMS*Calciumfluor. **Cell Biology Internationa**, vol. 23, n. 1, p. 31-40, 1999. cbir 1998.0312.

PALUDAN, S.R.; ELLERMANN-ERIKSEN, S.; LOVMAND, J.; MOGENSEN, S.C. Interleukin-4-mediated inhibition of nitric oxide production in interferon- γ -treated and virus-infected macrophages. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 49, p.169-176, 1999.

PARKIN, J.; COHEN, B.; Overview of the immune system, **The Lancet**, v. 357, 2001.

PATTERSON, R.; VEGA, L.; TROUBA, K.; BORTNER, C.; GERMOLÉC, D. Arsenic-induced alterations in the contact hypersensitivity response in Balb/c mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.198, 434– 443, 2004.

PEDALINO, C.M.V.; PERAZZO, F.F.; CARVALHO, J.C.T.; MARTINHO, K.S.; MASSOCO, C.; BONAMIM, L.V. Effect of *Atropa belladonna* and *Echinacea angustifolia* in homeopathic dilution on experimental peritonitis. **Homeopathy**, v.93, p. 193-198, 2004.

PIEMONTE, M. R. **Alterações Estruturais em Macrófagos Peritoneais de Camundongos Tratados com o Método Canova®**. Curitiba, 2000. Dissertação (Mestrado em Morfologia), Universidade Federal do Paraná.

PIEMONTE, M.R.; BUCHI, D.F. Analysis of IL-2, IFN- γ and TNF- α production, $\alpha_5\beta_1$ integrins and actin filaments distribution in intraperitoneal mouse macrophages treated with homeopatic medicament. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 3, 2002.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunological Methods**, vol. 38, p. 161-170, 1980.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme

immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, vol. 46, p. 211-226, 1981.

PRIBILA, J. T.; SHIMIZU, Y. Signal Transduction Events Regulating Integrin Function and T Cell Migration. **Immunologic Research**, v. 27, n.1, p. 107–128, 2003.

RETH, M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. **Nature Immunology**, v. 3, p. 1129–1134, 2002. doi:10.1038/ni1202-1129

SASSADA, M., PABST, M.J., JOHNSTON, JR. R.B. Activation of mouse peritoneal macrophages by lipopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NADPH oxidase. **J Biol Chem**.v. 258, n. 16, p. 9631–5, 1983.

SATO, D.Y.O.; WAL, R.; DE OLIVEIRA, C.C.; CATTANEO, R.I.I.; MALVEZZI, M.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a Brazilian homeopathic medication. **Homeopathy**, v. 94, n. 1, p. 26-32, 2005.

SEGAL, A. W.; ABO, A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. **TIBS**, v. 18, p. 43-47, 1993.

SELIGMANN, I.C.; LIMA, P.D.; CARDOSO, P.C.; KHAYAT, A.S.; BAHIA, M.O.; BUCHI, D.F.; CABRAL, I.R.; BURBANO, R.R. The anticancer homeopathic composite “Canova Method” is not genotoxic for human lymphocytes *in vitro*. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 2, p. 223-228, 2003.

SHEALY, N. **Enciclopédia ilustrada de remédios naturais**. Barcelona: editora Konemann, 1999.

SILVA, M.T. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of myeloid phagocyte system. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 87, p. 93-106, 2010. doi:10.1189/jlb.0809549

SMITS, E. L. M.; BERNEMAN, Z. N.; TENDELOO, V. F. I. Immunotherapy of Acute Myeloid Leukemia: Current Approaches. **The Oncologist**, v. 14, p. 240–252, 2009. doi: 10.1634/theoncologist.2008-0165

SNOECK, H. W.; LENJOU, M.; LARDON, F.; PEETERMANS, M. E.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; MOUJILIN, A.; HAENEN, L.; BERNEMAN, Z. N. Interleukin 4 and interferon gamma costimulate the expansion of early human myeloid colony-forming cells. Proposal of a model for the regulation of myelopoiesis by interleukin 4 and interferon gamma and its integration with the regulation of the immune response. **Leukemia**, v. 10, n. 1, p. 117-122, 1996.

STEINBRINK, K.; MAHNKE, K.; GRABBE, STEPHAN, ENK, A.; JONULEIT, H. Myeloid dendritic cell: From sentinel of immunity to key player of peripheral tolerance? **Human Immunology**, v. 70, p. 289-293, 2009.

SZABÓ, C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. **Toxicol Lett.** v. 140, p.105-12. 2003

TAYLOR, P.R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H-H.; BROWN, G.D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p.901–44, 2005.doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816

TRINCHERI, G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- γ). **Current Opinion in Immunology**, v. 9, p.17-23, 1997.

TOLEDO, J. A.; **Estudiate a ti mismo**. Buenos Aires, Argentina,: 1910, editora Casa Jacobo Peuser.

UNANUE, E. R., ALLEN, P. M. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. **Science**, v. 1, n. 236 (4801), p. 551–557, 1987

VAN FURTH, R., DIESSELHOF-DEN DULK, M.M.C., MATTIE, H., Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 138, p. 1314-1330, 1973.

VAN DER VEEN, R.C.; DIETLIN, T.A.; GRAY, J.D.; GILMORE, W. Macrophage-derived nitric oxide inhibits the proliferation of activated T helper cells and is induced during antigenic stimulation of resting T cells. **Cellular Immunology**, v.1999, p.43-49, 2000.

VAN DER VEEN, R.C. Nitric oxide and T helper cell immunity, **International Immunopharmacology**, v.1, p.1491–1500, 2001.

VARIN, A.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. **Immunobiology**, v.214, n.7, p.630-641, 2009.

VEAL, E. A; DAY, A. M; MORGAN, B. A. Hydrogen Peroxide Sensing and Signalin. **Molecular Cell**, v. 26, p. 1-14, 2007.

VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística**. 5^a ed, Ed. Campos, Rio de Janeiro, 1980.

VENKATA-REDDY, M.; GANGADHARAM, P.R.J. Heat shock treatment of macrophages causes increased released superoxide anion. **Infect. Immunol.**, v. 60, p. 2386-2390, 1992.

VICKERS, A.; ZOLLMAN, C. ABC of complementary medicine: Homoeopathy. **British Medical Journal**, vol.519, p. 1115-1118, 1999.

VIRÁG, L.; SZABÓ, E.; GERGELY, P.; SZABÓ, C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. **Toxicology letters**, vol. 40-141, p. 113-124, 2003.

VOJDANI, A.; ERDE, J. Regulatory T cells, a potent immunoregulatory target for CAM researchers: Modulating tumor immunity, autoimmunity and alloreactive immunity (III). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, p. 309-316, 2006.

WALACH, H.; KÖSTER, H.; HENNIG, T.; HAAG, G. The effects of homeopathic belladonna 30 CH in healthy volunteers – a randomized, double blind experiment. **Journal of Psychosomatic Research**, vol. 50, p. 155-160, 2001.

WEIGERT, A., BRÜNE, B. Nitric oxide, apoptosis and macrophage polarization during tumor progression. **Nitric Oxide**, v. 19, p. 95-102, 2008.

WOOD, K.J., AUSTYN, J.M. **Principles of celular and molecular immunology**. Oxford University press Inc, New York, 1993.

XIA, Y., ZWEIER, J.L. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 94, p. 6954-6958, 1997.

YANG, H.; YU, J.;FU, G.; SHI, X.; XIAO, L. ; CHEN, Y.; FANG, X.; HE, C. Interaction between single molecules of Mac-1 and ICAM-1 in living cells: An atomic force microscopy study. **Experimental cell research**, v. 313, p. 3497-3504, 2007.

YI, Q. Dendritic cell-based immunotherapy in multiple myeloma. **Leuk Lymphoma.**, v. 44, n. 12, p. 2031-8, 2003. DOI: 10.1080/1042819031000116599

ZDOLSEK, J. E.; EATON, J. W.; TANG, L. Histamine released and fibrinogen adsorption mediate acute inflammatory responses to biomaterial implants in humans. **J. Transl. Med.**, v. 5, n. 31, p. 1-16, 2007.

ZHOU, Y.; LIN, G.; MURTAUGH, M. P. Interleukin-4 suppresses the expression of macrophage NADPH oxidase heavy chain subunit (gp91-phox). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1265, p. 40-48, 1995.

ANEXOS

ANEXO 1 - OBTENÇÃO E COLETA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO

- Sacrificar os camundongos por deslocamento cervical.
- Prendê-los em uma cama de isopor forrada.
- Borrifar álcool 70% em água destilada para desinfecção do pelo.
- Levantar a pele ventral com o auxílio de duas pinças dente de rato, puxando-a em direções contrárias para que esta seja rompida e o peritônio exposto.
- Com uma seringa de 10 ml e agulha estéreis, injetar na cavidade peritoneal tampão PBS (Phosphate Buffer Solution), pH 7,2, gelado (4°C) e estéril, com o cuidado para não romper nenhuma víscera.
- Agitar a solução salina no interior do peritônio, dando batidas nas laterais do abdômen para que os macrófagos presos na parede do peritônio se soltem.
- Retirar a solução com a seringa e agulha. Este lavado conterá os macrófagos peritoneais.
- Transferir o lavado para um recipiente estéril e acondicioná-lo no gelo.

ANEXO 2 - OBTENÇÃO E COLETA DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGO

- Sacrificar os camundongos por deslocamento cervical.
- Prendê-los em uma cama de isopor forrada com plástico.
- Borrifar álcool 70% em água destilada para desinfecção do pelo
- Com o auxílio de uma tesoura pequena e de ponta fina, retirar os fêmures, limpar toda a pele e músculo e transportá-los para o fluxo laminar.
- Cortar as epífises
- Com uma seringa de 5 mL e uma agulha, injetar 2 mL de meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (acrescido de soro bovino fetal 10%, fetal contendo penicilina 1 U/ml, estreptomicina 1 µg/ml, e anfotericina 2,5 µg/l) dentro do fêmur, através de uma das aberturas feita com a remoção das epífises. Pode-se repetir esse processo, até que a diáfise do fêmur encontre-se mais clara do que anteriormente. Dessa forma, o meio de cultura "lava" as células do interior do osso.
- Colocar a suspensão celular em tubo de centrifuga (os grumos de células da suspensão podem ser desfeitos puxando-os e soltando-os com a agulha e seringa).
- centrifugar a 2.800 rpm por 3 minutos.
- Desprezar o sobrenadante e ressuspender as células em de meio de cultura.

ANEXO 3 - MEIO DE CULTURA DULBECCO'S MODIFIED EAGLE MEDIUM (DMEM)

- 1 pacote de pó para meio DMEM marca Gibco™
- 3,7g de bicarbonato de sódio
- 2,5g de N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid (HEPES).

Completar para 900 mL de água bidestilada

Filtrar com membrana de 0,22µm estéril.

- Adicionar 100 ml de soro bovino fetal (SBF) termoinativado Gibco™
- 200 U/mL de penicilina
- 100 µg/ml de estreptomicina
- 2,6 µg/ml de anfotericina

ANEXO 4 – INTERAÇÃO MACRÓFAGOS-LEVEDURA

- Após 48 horas de cultivo retirar o meio de cultura e lavar as células com meio DEMEM sem soro bovino fetal a 37°C,
- Adicionar as leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) em meio sem soro, e incubar a placa a 37°C e 5% CO₂ por duas horas, na proporção de 10 leveduras para cada macrófago, ou seja, 1×10^7 .
- Após o período de interação, lavar as células com PBS (pH 7,4, a 37°C) para remoção dos microrganismos não fagocitados,

ANEXO 5 – DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

segundo Green et al., 1982

⇒ Cultivar em placas de 96 poços ($3,5$ a 5×10^5 células/poço) pelo tempo determinado, OBS: caso o tratamento seja *in vivo* adicionar as células e deixar aderir por 15 minutos em estufa 37°C com 5% de CO_2 .

⇒ Como controle positivo adicionar a alguns poços LPS (50ng/ml) e IFN- γ (26U/ml), em meio DMEM e incubar por 24 horas.

⇒ Retirar 100 μl do sobrenadante e transferir para uma outra placa,

⇒ Adicionar 100 μl do reagente de Griess*

⇒ Incubar 10 minutos a temperatura ambiente,

⇒ Ler a absorbância em leitor de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 550nm, OBS: utilizar um poço como branco, contendo apenas o reagente de Griess.

⇒ Calcular a concentração de NO, utilizando curva padrão de nitrito de sódio (10 – 80 μM).

*Reagente de Griess (GREEN ET AL., 1982).

Foram preparadas duas soluções mães:

Solução A: Naftiletilenodiamino 0,1% (p/v) em ácido-ortofosfórico 5%(v/v)

Solução B: Sulfonamina p-aminobenzeno 1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v).

As duas soluções A e B foram misturadas no momento imediato do uso na proporção de 1:1.

Obs.: As soluções separadas podem ser estocadas na geladeira por 1 mês.

ANEXO 6 – DETECÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂)

segundo Pick e Mizel, 1981

⇒ Cultivar em placas de 96 poços (3,5 a 5 x 10⁵ células/poço) pelo tempo determinado, OBS: caso o tratamento seja *in vivo* adicionar as células e deixar aderir por 20 minutos em estufa 37°C com 5% de CO₂.

⇒ Lavar o meio de cultivo com “Hank’s Buffered Salt Solution” (HBSS) a 37°C,

⇒ Adicionar meio de reação (MR) contendo vermelho de fenol a 1M e 15 U/ml de peroxidase (HRPO tipo VI-A, 1310U/ml – Sigma) dissolvidos em HBSS (com ou sem drogas testadas),

⇒ Como controle positivo adicionar ao MR forbol miristato acetato (PMA) na concentração de 1µl/ml. Como branco utilizar apenas o MR.

⇒ Após o tempo desejado, retirar o sobrenadante e passar para uma placa nova de 96 poços contendo 10µl de solução aquosa de NaOH 1N em cada poço,

⇒ A oxidação do vermelho de fenol deverá ser quantificada através de leitura da absorbância em leitor de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 620 nm. Os resultados serão obtidos em densidade óptica e deverão ser comparados com uma curva padrão de concentrações variáveis de H₂O₂.

Curva:

⇒ Diluir o H₂O₂ a 1:10, 1:100 e 1:1000 em água destilada e obter a concentração dessas soluções através de sua absorbância em 240 nm (em espectrofotômetro, utilizando cubeta de quartzo e lâmpada de deutério),

⇒ Utilizar a absorbância encontrada na solução 1:1000 na fórmula $C = A/\epsilon$ (Onde A = absorbância, $\epsilon = 39,58 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e C = concentração),

⇒ Preparar uma solução mãe (concentração de 1 mmolar) a partir da solução de H₂O₂ 1:100 em vermelho de fenol 1M diluído em HBSS,

⇒ Preparar soluções nas concentrações de 1, 10, 25 e 50 nmoles e colocá-los em banho maria à 37°C,

⇒ Adicionar peroxidase na concentração final de 15U/ml e após 15 minutos adicionar 10 µl de NaOH a 1M,

⇒ Ler em leitor de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 620 nm utilizando como branco apenas a solução mãe.

ANEXO 7 – DETECÇÃO DE ANION SUPERÓXIDO (O_2^-)

segundo Johnston, Godzik e Cohn, 1978

⇒ Cultivar em placas de 96 poços ($3,5$ a 5×10^5 células/poço) pelo tempo determinado, OBS: caso o tratamento seja *in vivo* adicionar as células e deixar aderir por 20 minutos em estufa 37°C com 5% de CO_2 .

⇒ Lavar o meio de cultivo com “Hank’s Buffered Salt Solution” (HBSS) a 37°C ,

⇒ Adicionar meio de reação contendo citocromo c $80 \mu\text{M}$ dissolvido em HBSS
OBS: P.M. citocromo c = 12327

⇒ Como controle positivo adicionar ao meio de reação PMA na concentração de $1 \mu\text{l/ml}$, OBS: utilizar um poço como branco, contendo o meio de reação sem as células.

⇒ Após a incubação retirar $100 \mu\text{l}$ do meio de reação e passar para uma placa nova e ler a absorbância em leitor de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 550nm .

⇒ Na leitura os poços devem ser zerados com o branco = HBSS + citocromo c

Cálculo:

⇒ Para determinar a concentração de O_2^- correspondente à concentração de citocromo c reduzido usa-se o Coeficiente de Extinção Molar ($\epsilon = 2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$):

⇒ $C = A/\epsilon$

ANEXO 8 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

- Fixação: Gutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 por 2 horas em temperatura ambiente.
- Lavagem em Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, 3 vezes 10 minutos cada.
- Pós-fixação: Tetróxido de Ósmio 1% em Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, por 15 minutos, no escuro e à temperatura ambiente
- Lavagem em Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, 3 vezes.
- Desidratação: álcool 50%, 70%, 90% e 100%, de 10 a 20 minutos cada.
- Ponto Crítico: CO₂
- Metalização: ouro
- Observação : Microscópio Eletrônico de Varredura

ANEXO 9 - IMUNOCITOQUÍMICA PARA CITOMETRIA DE FLUXO

- Centrifugação do sobrenadante da cultura;
- Sobrenadante desprezado e fixação do pellet com paraformaldeído (EMS) 1%, por 1 hora;
- Células aderidas na garrafa também foram fixadas com paraformaldeído (EMS) 1%, por 1 hora;
- Células aderidas, após a fixação, foram raspadas;
- Centrifugação das células fixadas;
- Sobrenadante desprezado;
- Lavagem com PBS;
- Concentração celular ajustada para 10^6 . Essa quantidade foi colocada em tubos eppendorfs® separados;
- Adição de 100µl de PBS e 1µl de anticorpo primário (concentração final do anticorpo 0,5µg%). Todos os anticorpos utilizados são biotinilados;
- Incubação por 40 minutos;
- Centrifugação dos tubos e sobrenadante desprezado;
- Adição de 100µl de PBS e 1µl de cada anticorpo secundário, streptavidina, em cada tubo. O anticorpo secundário está conjugado com o fluorocromo phicoeritrina (concentração final do anticorpo 0,5µg%);
- Incubação por 30 minutos, no escuro;
- Centrifugação dos tubos e sobrenadante desprezado;
- Lavagem das células com 100µl de PBS;
- Centrifugação das células e sobrenadante descartado;
- Adição, a cada tubo, de 800µl de PBS para a leitura no citômetro de fluxo;
- Foram feitos mais dois tubos, um apenas com células sem marcação e outro com células incubadas apenas com o anticorpo secundário, ambos para zerar o aparelho;
- Leitura no citômetro de fluxo.

ANEXO 10 - IMUNOCITOQUÍMICA PARA MICROSCOPIA CONFOCAL

- Até a fixação das células, a placa foi mantida sobre o gelo;
- Retira-se o meio de cultura dos poços e lavam-se as células 10 vezes, com PBS (o PBS foi colocado e, ao mesmo tempo, retirado dos poços com o auxílio de duas pipetas de 10 ml);
- Bloqueio dos sítios inespecíficos das células com uma solução de PBS/BSA 1% por 20 minutos.
- Lavam-se as células com PBS, da maneira já citada;
- Incubação com os anticorpos primários, diluídos em PBS/BSA 1%, durante 40 minutos. A concentração final dos anticorpos foi de 1µg%;
- Lavam-se as células com PBS, da maneira já citada;
- Fixação das células. Para este procedimento, as lamínulas foram transferidas para uma placa de cultivo nova, para se evitar a presença de restos celulares. Antes da transferência das lamínulas deve se colocar 500µl de PBS em cada poço para evitar a secagem do material;
- O PBS foi retirado e adicionado paraformaldeído (PFA) 2% em PBS, por 30 minutos a temperatura ambiente;
- Novamente, lavam-se as células com PBS, da maneira já citada;
- Bloqueio dos radicais aldeídos do PFA, com glicina 0,1M em PBS (300µl por poço), por 2 minutos;
- Lavam-se as células com PBS, da maneira já citada;
- Nesta etapa o procedimento pode ser interrompido, desde que as células sejam mantidas a 4°C e os poços estejam bem preenchidos com PBS;
- Novo bloqueio dos sítios inespecíficos das células com a solução de PBS/BSA 1% por 20 minutos;
- Lavam-se as células com PBS, da maneira já citada;
- Incubação com o anticorpo anti porção Fc (Fc block), diluído em PBS/BSA 1%, durante 40 minutos, na concentração final de 1µg%;

- O anticorpo secundário streptavidina diluído em PBS/BSA 1% e conjugado com o fluorocromo ficoeritrina foi ajustado a concentração de 1µg%.
- Centrifugação deste anticorpo, por 10 minutos a 10.000 rpm, para evitar precipitados;
- Incubação 40 minutos, no escuro.
- Lavam-se as células com PBS, da maneira já citada, repetindo-se o procedimento duas vezes;
- Retirada das lamínulas da placa de cultivo, mergulhadas rapidamente em água destilada e montadas;
- Montagem das lâminas com meio de montagem para fluorescência, contendo DAPI (corante nuclear), da marca Vectashield®.
- Armazenamento das lâminas no escuro, a 4°C. Após a secagem, estas foram vedadas com esmalte e mantidas armazenadas até a visualização do material ao microscópio confocal.

OBS: As células não podem secar em nenhum momento do experimento

ANEXO 11 - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA

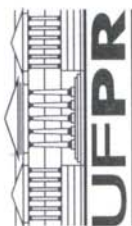


Ministério da Educação

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Setor de Ciências Biológicas

Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

**CERTIFICADO****N.º 179**

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA N.º 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO N.º 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos que utilizam animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

APROVADO.**PROCESSO: 23075.023657/2006-71****RO 07/2006 em 04/07/2006****TÍTULO: Avaliação morfológica e bioquímica de macrófagos tratados com medicamentos homeopáticos**

AUTORES: Dory de Freitas Buchi, Simone Martins de Oliveira, Carolina Camargo de Oliveira, Ana Paula Abud, Beatriz César, Fernando de Souza Fonseca Guimarães

DEPARTAMENTO:

Biologia Celular

Curitiba,

07 de julho de 2006.

Prof.^a Ana Maria Filadelfi
Coordenadora do CEEA